

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**OTIMIZAÇÃO DE UM PLASMÍDEO VACINAL POR
INTRODUÇÃO DE ELEMENTOS DE
DIRECIONAMENTO NUCLEAR A SER VEICULADO
POR *Lactococcus lactis***

ORIENTADA: **Camila Prósperi de Castro**

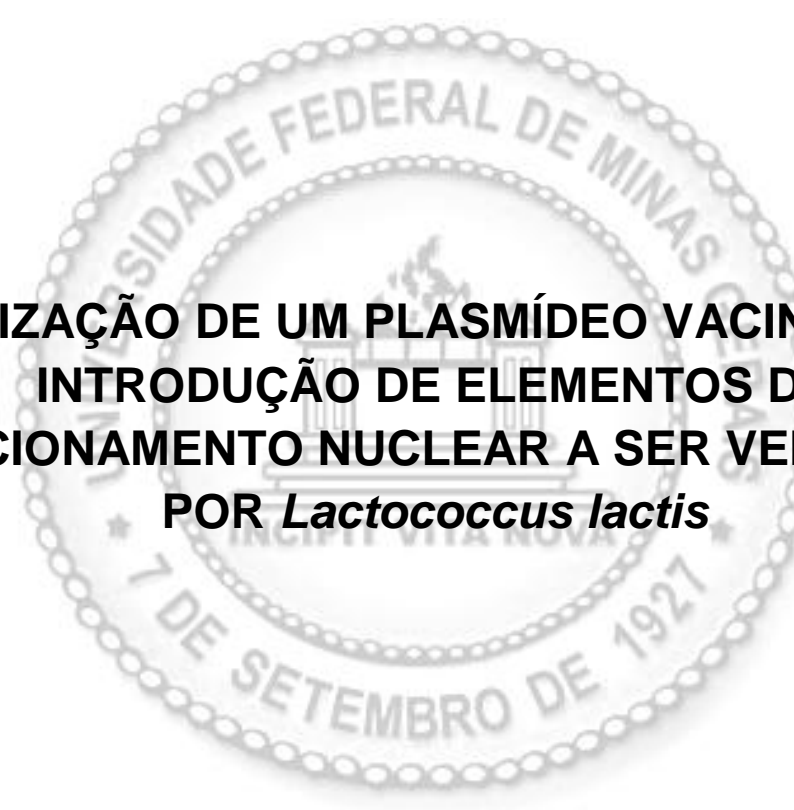
ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

CO-ORIENTADORA: **Dr^a. Sophie Leclercq**

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2012

Camila Prósperi de Castro



**OTIMIZAÇÃO DE UM PLASMÍDEO VACINAL POR
INTRODUÇÃO DE ELEMENTOS DE
DIRECIONAMENTO NUCLEAR A SER VEICULADO
POR *Lactococcus lactis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

CO-ORIENTADORA: Dr^a. Sophie Leclercq

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2012

043 Castro, Camila Prósperi de.
Otimização de um plasmídeo vacinal por introdução de elementos de direcionamento nuclear a ser veiculado por *Lactococcus lactis* [manuscrito] / Camila Prósperi de Castro. – 2012.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Anderson Miyoshi. Co-orientadora: Sophie Leclercq.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética – Teses. 2. Vacinas de DNA – Teses. 3. Bactérias produtoras do ácido láctico – Teses. 4. *Lactococcus lactis* – Teses. 5. Importação nuclear. 6. Sequência de endereçamento nuclear. I. Miyoshi, Anderson. II. Leclercq, Sophie. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

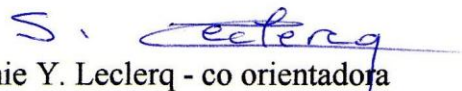


"Otimização de um plasmídeo vacinal por introdução de elementos de direcionamento nuclear a ser veiculado por *Lactococcus lactis*"

Camila Prósperi de Castro

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Anderson Miyoshi - Orientador
UFMG


Prof. Sophie Y. Leclercq - co orientadora
FUNED


Prof. Alvaro Cantini Nunes
UFMG


Profa Débora de Oliveira Lopes
UFSJ

Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais, Sérgio e Rosângela, pelo tamanho empenho em me proporcionarem uma educação de qualidade e por serem meus maiores incentivadores nessa caminhada. Dedico também aos meus irmãos, Victor Rafael e Sérgio Augusto, por serem, desde sempre, meus melhores amigos.

*“Somos o que repetidamente fazemos.
A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito.”*

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sérgio e Rosângela, por todo amor e dedicação, pelas batalhas diárias e por serem meu porto seguro sempre. Vocês são os maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui. Muito obrigada!

Ao meu irmão Sérgio por todo apoio e carinho e ao Victor, por ser extremamente gentil, companheiro e por tantas vezes ter me auxiliado, não somente durante este período, mas por todo tempo.

Aos meus demais familiares, pela torcida e apoio constantes, em especial à tia Sirlene, por todo seu carinho e auxílio durante minha preparação para o Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Miyoshi, pela oportunidade concedida ao me receber no Laboratório de Genética Celular e Molecular, por sua valiosa orientação durante esses anos, por sua tamanha disponibilidade e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Vasco Azevedo pelo apoio, incansável motivação e pela confiança.

À Dr^a. Sophie Leclerq, pela co-orientação e importantes considerações.

À Dr^a. Janete Santos e ao doutorando Rafael Pires, pela inestimável ajuda e boa vontade em auxiliar os experimentos de Cultura Celular e Citometria de Fluxo.

A todo o pessoal dos Laboratórios de Inovação Biotecnológica e Cultura Celular, da Fundação Ezequiel Dias, pela agradável recepção.

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética e demais Departamentos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelo tempo dispensado à leitura desta dissertação.

Aos colegas e amigos do LGCM: Alfonso Gala, Amjad Ali, Anderson Santos, Anne Cybelle, Aryane Magalhães, Bianca Souza, Boutros Sarrouh, Camila Azevedo, Carlos Diniz, Clarissa Rocha, Daniela Santos, Dayana Ribeiro, Eudes Barbosa, Fernanda Dorella, Fernanda Lima, Fernanda Militão, Flávia Figueira, Flávia Rocha, Karina Fiaux, Kátia Morais, Luís Guimarães,

Marcela Santiago, Meritxell Turk, Núbia Seyffert, Pablo Moraes, Pamela Mancha, Rachid Aref, Renata de Faria, Rodrigo Dias, SÍntia Almeida, Siomar de Castro, Tessália Saraiva, Thiago Castro, Ulisses Pádua, Vanessa Bastos, Vanessa Pfeiffer, Vinícius Abreu e Wanderson Marques, por todo o auxílio, apoio e críticas construtivas a este trabalho.

Agradecimentos especiais à Kátia Morais, por todos os ensinamentos fundamentais durante o período da minha Iniciação Científica (e que se estendem até hoje), pela torcida e amizade. Pamela Mancha, Fernanda Lima e Meritxell Turk por tornarem os dias de trabalho muito mais leves e pelos muitos sorrisos proporcionados; obrigada por tudo amigas! Wanderson Marques, pelo grande companheirismo e discussões durante os turnos noturnos. Camila Azevedo, Fernanda Militão e Flávia Rocha, por toda gentileza e prestatividade. Tessália Saraiva, pelos esclarecimentos e grande ajuda prestada.

Às secretárias Márcia Natália, Fernanda Magalhães e Mary das Graças, pela grande torcida e apoio.

Às amigas: Alexandra Bittencourt, Anna Christina, Daniele Couto, Elisiane Pereira, Izabela Velho, Juliana Tavares, Julieta Alcântara, Maria Izabel Correa, Mariana Melgaço, Mariana Ubaldino, Maristela Souza, Mayra Silva e Nathália Teodoro, obrigada de todo coração pela amizade de vocês, pelo incentivo, apoio, pela companhia e por compreenderem por vezes minha ausência. Obrigada também por estarem sempre torcendo “por minhas bactérias”!

Finalmente, obrigada a todos aqueles que porventura eu tenha deixado de mencionar, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1 APRESENTAÇÃO.....	3
1.1 COLABORAÇÕES.....	4
1.2 INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	8
2 INTRODUÇÃO	9
2.1 VACINAS DE DNA.....	10
2.1.1 <i>Histórico</i>	10
2.1.2 <i>Vacinas de DNA aprovadas e em ensaios clínicos</i>	11
2.1.3 <i>Estruturas dos vetores vacinais</i>	11
2.1.3.1 <i>Propagação Procariótica</i>	12
2.1.3.2 <i>Unidade Transcricional</i>	13
2.1.4 <i>Mecanismo de ação das vacinas de DNA</i>	14
2.1.5 <i>Vantagens das vacinas de DNA</i>	16
2.1.6 <i>Vias de administração e sistemas carreadores de vacinas de DNA</i>	17
2.1.7 <i>Bactérias na entrega de vacinas de DNA</i>	18
2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	20
2.2.1 <i>Características gerais</i>	20
2.2.2 <i>Lactococcus lactis como veículo carreador para entrega de vacinas gênicas</i>	21
2.3 LIMITAÇÕES DAS VACINAS DE DNA	23
2.3.1 <i>Obstáculos intracelulares a serem transpostos por uma vacina gênica</i>	24
2.3.2 <i>Acesso da vacina de DNA ao interior do compartimento nuclear</i>	25
2.3.3 <i>Otimização de vetores</i>	26
2.3.3.1 <i>Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40</i>	27
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM.....	33
4.2 MANIPULAÇÃO DO DNA.....	35
4.3 RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA.....	36
4.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pVALAC::DTS::GFP	37
4.4.1 <i>Confecção de Escherichia coli eletrocompetente</i>	37
4.4.2 <i>Amplificação da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40</i>	38
4.4.2.1 <i>Eluição do plasmídeo pJ204</i>	38
4.4.2.2 <i>Amplificação da DTS de SV40</i>	38
4.4.3 <i>Digestão enzimática e purificação do fragmento referente à DTS de SV40</i>	39
4.4.4 <i>Extração do plasmídeo pValac::gfp</i>	39
4.4.5 <i>Digestão enzimática e purificação do plasmídeo pValac::gfp</i>	40

4.4.6	<i>Desfosforilação do plasmídeo pValac::gfp com Fosfatase Alcalina de Camarão</i>	41
4.4.7	<i>Ligação da DTS de SV40 ao plasmídeo pValac::gfp</i>	42
4.4.8	<i>Transformação de E. coli TG1 eletrocompetente com o plasmídeo pValac::DTS::gfp</i>	42
4.4.9	<i>Confirmação da presença da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::DTS::gfp</i>	42
4.4.9.1	<i>Reação de sequenciamento e análises in silico</i>	43
4.5	VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO PLASMÍDEO PVALAC::DTS::GFP EM CULTURA DE CÉLULAS MAMÍFERAS	44
4.5.1	<i>Cultura de células CHO (Chinês Hamster Ovary)</i>	44
4.5.2	<i>Transfecção de células CHO com os plasmídeos pValac::DTS::gfp e pValac::gfp</i>	45
4.5.2.1	<i>Obtenção do DNA para transfecção</i>	45
4.5.2.2	<i>Padronização da transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::gfp, utilizando o reagente Lipofectamine 2000™ (Invitrogen)</i>	46
4.5.2.3	<i>Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::DTS::gfp</i>	47
4.5.3	<i>Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência</i>	47
4.5.4	<i>Ensaio de Citometria de Fluxo para comparação da expressão de GFP por células CHO transfectadas com os plasmídeos pValac::DTS::gfp e pValac::gfp</i>	47
4.5.4.1	<i>Análises estatísticas</i>	49
4.5.5	<i>Ensaio de transcrição reversa e RT-PCR</i>	49
4.5.5.1	<i>Extração do RNA total</i>	50
4.5.5.2	<i>Síntese do cDNA e RT-PCR</i>	50
4.6	OBTENÇÃO DE LACTOCOCCUS LACTIS FNBP⁺ CARREANDO O VETOR PVALAC::DTS::GFP	51
4.6.1	<i>Confecção de células eletrocompetentes de L. lactis FnBP⁺</i>	51
4.6.2	<i>Transformação de L. lactis FnBP⁺ com o plasmídeo pValac::DTS::gfp</i>	52
4.6.3	<i>Extração do DNA plasmidiano de L. lactis FnBP⁺ (pValac::DTS::gfp)</i>	53
4.6.4	<i>Confirmação dos clones de L. lactis FnBP⁺ (pValac::DTS::gfp)</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DE ENDEREÇAMENTO NUCLEAR (DTS) DE SV40 NO PLASMÍDEO PVALAC::GFP	55
5.1.1	<i>Amplificação e purificação da DTS de SV40</i>	55
5.1.2	<i>Extração, digestão e purificação do plasmídeo pValac::gfp</i>	57
5.1.3	<i>Clonagem da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::gfp</i>	58
5.1.4	<i>Reação de sequenciamento e análises in silico</i>	59
5.2	VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO PLASMÍDEO PVALAC::DTS::GFP EM CULTURA DE CÉLULAS MAMÍFERAS	60
5.2.1	<i>Padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac::gfp</i>	61
5.2.2	<i>Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência</i>	62
5.2.3	<i>Análises Citométricas</i>	63
5.2.4	<i>Ensaio de transcrição reversa e RT-PCR</i>	67
5.2.4.1	<i>Extração do RNA total</i>	67
5.2.4.2	<i>Síntese do DNA complementar (cDNA) e RT-PCR</i>	69
5.3	CONSTRUÇÃO DA LINHAGEM DE L. LACTIS FNBP⁺ CONTENDO O PLASMÍDEO PVALAC::DTS::GFP	70
5.3.1	<i>Obtenção da linhagem invasiva L. lactis FnBP⁺ (pValac::DTS::gfp)</i>	70
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
6.1	CONCLUSÕES	73
6.2	PERSPECTIVAS	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de um plasmídeo vacinal.....	12
Figura 2: Representação esquemática da indução da imunidade celular e humoral por vacinas de DNA.....	15
Figura 3: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica	19
Figura 4: Representação esquemática das barreiras celulares à importação nuclear de plasmídeos vacinais	25
Figura 5: Representação esquemática da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40.....	27
Figura 6: Modelo de importação nuclear de plasmídeos vacinais que possuem a DTS de SV40.....	28
Figura 7: Representação esquemática do plasmídeo de expressão eucariótica pValac:: <i>gfp</i>	41
Figura 8: Perfil puntual representativo de células CHO.....	49
Figura 9: Análise do produto de amplificação por PCR, e purificação da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40	56
Figura 10: Análise do produto da extração plasmideana, digestão enzimática e purificação do vetor pValac:: <i>gfp</i>	57
Figura 11: Confirmação da presença da Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 no vetor pValac::DTS:: <i>gfp</i> , através de PCR e digestão enzimática.....	59
Figura 12: Sequência nucleotídica obtida através de sequenciamento do inserto contido no vetor pValac::DTS:: <i>gfp</i>	60
Figura 13: Resultado da padronização da transfecção das células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac:: <i>gfp</i>	61

Figura 14: Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência.....	62
Figura 15: Eventos adquiridos por Citometria de Fluxo, plotados em função de seu tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e emissão de fluorescência (FL-1).....	64
Figura 16: Análise do efeito da DTS sobre a eficiência de transfecção e expressão gênica.	65
Figura 17: Verificação de contaminação por DNA plasmideano da amostra de RNA extraído, através de PCR	68
Figura 18: Produtos de RT-PCR obtidos a partir do RNA total convertido ou não em cDNA, extraído de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::DTS::gfp.....	69
Figura 19: Confirmação da obtenção da linhagem <i>L. lactis</i> FnBPA+(pValac::DTS::gfp).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens da utilização de vacinas de DNA.	17
Tabela 2: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados	33
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados neste trabalho	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amp	-	Ampicilina
APC	-	Célula Apresentadora de Antígeno
ATP	-	Adenosina Trifosfato
BCR	-	Receptor de Célula B
BGH	-	Hormônio do Crescimento Bovino
BHI	-	Meio de Cultura Infusão de Cérebro e Coração
BL	-	Bactéria Láctica
BLG	-	β -Lactoglobulina
cDNA	-	DNA Complementar
CHO	-	Células de Ovário de Hamster Chinês
Cm	-	Cloranfenicol
cm²	-	Centímetro Quadrado
CMV	-	Citomegalovírus
CO₂	-	Dióxido de Carbono
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	-	Desoxirribonuclease
dNTPs	-	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DO	-	Densidade Óptica
DTS	-	Sequência de Endereçamento Nuclear
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetracético
Ery	-	Eritromicina
F	-	Oligonucleotídeo Senso
FACS	-	" <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> "
fg	-	Ficograma
FL-1	-	Fluorescência do Tipo 1
FnBPA	-	Proteína A de Ligação à Fibronectina
FSC	-	Parâmetro Tamanho Celular
g	-	Gramma
GAPDH	-	Gliceroldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GFP	-	Proteína Verde Fluorescente
GRAS	-	Geralmente Reconhecido Como Seguro
HCl	-	Ácido Clorídrico

HEPES	-	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
InIA	-	Internalina A
kb	-	Quilobases
KCl	-	Cloreto de Potássio
kDa	-	Quilodaltons
L	-	Litro
LB	-	Meio de Cultura Luria-Bertani
LPS	-	Lipopolissacarídeo
M	-	Molar
M17-Sac-Gli	-	Meio de Cultura M17 Sacarose Glicose
MFI	-	Mediana da Intensidade de Fluorescência
mg	-	Miligrama
MgCl₂	-	Cloreto de Magnésio
MgSO₄	-	Sulfato de Magnésio
MHC	-	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
mRNA	-	RNA Mensageiro
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
ng	-	Nanograma
NLS	-	Sinal de Localização Nuclear
nm	-	Nanômetro
NPC	-	Complexo do Poro Nuclear
ORF	-	Fase de Leitura Aberta
PAMPs	-	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
pb	-	Pares de Bases
PBS	-	Tampão Fosfato Salina
pCMV	-	Promotor do Citomegalovírus
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG3000	-	Polietileno Glicol 3000
pmol	-	Picomol
poli-A	-	Sequência Sinal de Poliadenilação
pSV40	-	Promotor do Vírus SV40
pRSV	-	Promotor do Rous Vírus
pValac	-	Plasmídeo " <i>Vaccination using <u>l</u>actic <u>a</u>cid <u>b</u>acteria</i> "

qPCR	-	PCR Quantitativa
q.s.p.	-	Quantidade Suficiente Para
R	-	Oligonucleotídeo Anti-Senso
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RNase A	-	Ribonuclease A
rpm	-	Rotações por Minuto
rRNA	-	RNA Ribossômico
RT-PCR	-	Transcriptase Reversa PCR
SDS	-	Dodecilsulfato de Sódio
SMC	-	Sítio Múltiplo de Clonagem
SSC	-	Parâmetro Granulosidade Celular
SV40	-	Vírus Símio 40
TBE	-	Tris-Borato-EDTA
TCR	-	Receptor de Célula T
TE-LYS	-	Tris-EDTA-Lisozima
TSB	-	Caldo Trípico de Soja
Tris	-	Tris(hidroximetil)aminometano
U	-	Unidades
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia
V	-	Volts
X	-	Vezes
W	-	Watts
Ω	-	Ohm (resistência)
°C	-	Grau Celsius
μF	-	Microfarad (capacitância)
μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
μm	-	Micrômetro
μM	-	Micromolar

RESUMO

Lactococcus lactis, a bactéria láctica modelo, é considerada segura e vem sendo há muito utilizada para produção e entrega de antígenos e citocinas às superfícies de mucosas. Mais recentemente, os estudos envolvendo este microorganismo têm também focado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas de DNA, plataforma vacinal inovadora que envolve a administração de um vetor plasmideano de expressão eucariótica capaz de codificar proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras e que apresenta grande potencial como agente profilático e terapêutico. Todavia, a despeito das metodologias de entrega de vacinas de DNA até o momento desenvolvidas apresentarem relativa eficiência na entrega dos plasmídeos vacinais às células hospedeiras, estas são falhas em direcioná-los para o núcleo celular, evento crucial para que a ORF de interesse seja expressa e a vacina de DNA desempenhe sua função. Considerando que o envelope nuclear constitui o maior obstáculo à entrada dos plasmídeos vacinais no núcleo das células alvo, a otimização do direcionamento destes para o núcleo, bem como a transposição desta barreira é de fundamental importância para a eficácia de uma vacina gênica. Com o objetivo de melhorar os níveis de importação nuclear e de expressão gênica a partir de um plasmídeo vacinal desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (pValac; *Vaccination using lactic acid bacteria*), a ser entregue especificamente por uma linhagem invasiva de *L. lactis*, este trabalho procurou otimizá-lo através da inserção de uma sequência nucleotídica do vírus símio 40 (SV40, do inglês *Simian Virus 40*), descrita como sendo capaz de direcionar DNA exógeno ao núcleo de células eucarióticas e aumentar a expressão gênica a partir dos plasmídeos que a contenham. Esta sequência, denominada Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS, do inglês *DNA nuclear Targeting Sequence*), foi clonada no vetor pValac e para avaliação da funcionalidade desta construção, a ORF da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) foi utilizada como repórter. A avaliação da funcionalidade da construção final pValac::DTS::gfp se deu por meio de sua transfecção em células mamíferas e análises através de microscopia de fluorescência e RT-PCR. Para efeito de comparação entre a expressão de GFP a partir do plasmídeo pValac::DTS::gfp e do plasmídeo controle pValac::gfp, foram realizados ensaios de Citometria de Fluxo. Os resultados mostraram que a presença da DTS no plasmídeo pValac::gfp não foi capaz de aumentar a expressão da proteína GFP, resultados estes que estão em desacordo com a maioria daqueles reportados pela literatura.

ABSTRACT

Lactococcus lactis, the Lactic Acid Bacteria model, is considered to be safe and has been widely used for the production and delivery of antigens and cytokines to the mucosal level. More recently some studies have focused on their use as delivery vehicles of DNA vaccines, an innovating vaccine platform that involves administration of a plasmid vector of eukaryotic expression capable of coding immunogenic or immunomodulatory proteins with high potential as profilaxic and/or therapeutic agent. DNA vaccine delivery methodologies developed till today present relative efficacy in delivering the vaccine plasmids to host cells, although they are failures in their delivery to the cell nucleus, which is the crucial event for expression of the ORF of interest and DNA vaccine action. Considering that the nuclear envelope constitutes the major obstacle for nuclear entry of vaccine plasmids into target cells, optimizing the delivery of these to the nucleus, as well as transpositioning this barrier, is of fundamental importance for the efficiency of a DNA vaccine. With the objective of improve nuclear import levels and gene expression of a vaccine plasmid developed by our research group (pValac; *Vaccination using lactic acid bacteria*), to be delivered specifically by an invasive strain of *L. lactis*, this work's goal was to optimize this plasmid by inserting a nucleotide sequence from the simian virus 40 (SV40), characterized by its capacity to deliver exogenous DNA to the nucleus of eukaryotic cells and increase gene expression of the plasmids that contain it. This sequence, called DNA nuclear Targeting Sequence (DTS) was cloned into the pValac vector and in order to evaluate the functionality of this construction, the ORF of the Green Fluorescent Protein (GFP) was used as reporter. The functionality of the final construction, pValac::DTS::*gfp*, was assessed by transfection of mammalian cells and analysed through fluorescent microscopy and RT-PCR. In order to compare GFP expression between the pValac::DTS::*gfp* plasmid and the control plasmid, pValac::*gfp*, flow cytometry experiments were also performed. The obtained results showed that the presence of the DTS in the pValac::*gfp* plasmid was not able to improve the expression of the reporter protein, disagreeing with most of the results reported in the literature.

1 APRESENTAÇÃO

1.1 COLABORAÇÕES

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Laboratório de Inovação Biotecnológica (LIB) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esta colaboração se deu devido ao interesse mútuo dos laboratórios acima citados em promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e terapêuticas para as bactérias lácticas. Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do Professor Doutor Anderson Miyoshi (LGCM – UFMG) e co-orientação da Doutora Sophie Leclercq (LIB – FUNED), contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

1.2 INTRODUÇÃO GERAL

As “vacinas de DNA” “ou “vacinas gênicas”, como também são conhecidas, representam as mais recentes formas de imunização e constituem uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas ao sistema imune. Esta tecnologia inovadora envolve a administração de vetores plasmídeos contendo um cassete de expressão eucariótica, no qual sequências codificadoras de proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras são inseridas, sendo possível a síntese destas proteínas pelo próprio indivíduo vacinado, com consequente apresentação das mesmas ao sistema imune e proteção (Gurunathan *et al.*, 2000). A utilização destas vacinas oferece uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando comparada às vacinas tradicionais. Em relação ao seu perfil de segurança, as vacinas de DNA são capazes de induzir imunidade humoral e celular, assim como as vacinas baseadas em patógenos atenuados, sem, contudo, apresentarem os riscos associados àquela estratégia. Devido ao fato de que os plasmídeos vacinais podem ser facilmente replicados em bactérias, é possível uma produção rápida, barata e em larga escala e, além disso, por serem estáveis à temperatura ambiente, as vacinas gênicas não necessitam de refrigeração (Kutzler e Weiner, 2008).

Atualmente, diversos métodos de administração de vacinas de DNA estão disponíveis, sendo que a utilização de bactérias enteropatogênicas atenuadas para esta finalidade tem se apresentado como uma estratégia interessante, sobretudo para imunização por via de mucosas (Schoen *et al.*, 2004). Todavia, o risco de reversão ao fenótipo patogênico destes microorganismos existe, fato que deve ser levado em consideração principalmente quando se trata de sua administração a crianças e indivíduos imunocomprometidos (Dunham, 2002). Tal situação poder ser contornada pela utilização de bactérias não patogênicas, cenário no qual as bactérias lácticas (BL) se destacam como alternativa promissora (Wells e Mercenier, 2008).

As BL constituem um grupo diverso de microrganismos Gram-positivos, que dentre outras características compartilhadas, possuem a capacidade de converterem açúcares em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007). Dentre os representantes deste grupo, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como um microorganismo modelo no estudo dos mesmos, não só por sua importância econômica, mas também devido ao fato de esta bactéria ser de fácil manipulação, possuir o status “GRAS” (“Generally Recognized As Safe”), ter sido a primeira BL cujo genoma foi sequenciado (Bolotin *et al.*, 2001) e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (de Vos, 1999; Nouaille *et al.*, 2003). Desta forma, *Lactococcus lactis* vem sendo há muito utilizada para produção e entrega de antígenos e citocinas às superfícies de mucosas (Wells e Mercenier, 2008), sendo que mais recentemente, os estudos envolvendo esta bactéria têm

se concentrado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas de DNA (Pontes *et al.*, 2011).

Neste contexto, uma linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína A de ligação à Fibronectina (FnBPA, do inglês *Fibronectin-Binding Protein A*) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi testada pelo grupo de pesquisa no qual o presente trabalho se encontra inserido, no intuito de melhorar a entrega de DNA às células mamíferas (Innocentin *et al.*, 2009). A proteína FnBPA medeia a adesão de *S. aureus* ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000), portanto, sua utilização poderia facilitar a entrega dos plasmídeos vacinais. Resultados *in vitro* revelaram que a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ foi capaz de invadir células epiteliais humanas da linhagem Caco-2 de maneira mais eficiente que uma outra linhagem, não invasiva e, por fim, entregar mais DNA àquelas células (Innocentin *et al.*, 2009). Além disso, um novo plasmídeo, chamado pValac (*Vaccination using lactic acid bacteria*) foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovírus (pCMV), (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) sequência sinal de poliadenilação do Hormônio de Crescimento Bovino (BGH poli-A), (iii) origens de replicação, de modo a permitir a propagação deste plasmídeo tanto em *Escherichia coli* quanto em *L. lactis*, e (iv) um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, para seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009). Ademais, para verificação de sua funcionalidade, a ORF repórter da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) foi inserida neste vetor, dando origem ao pValac::*gfp* (Guimarães *et al.*, 2009). Devido ao seu pequeno tamanho (3.742 pb), o pValac permite a clonagem de grandes fragmentos gênicos em sua estrutura, representando, dessa maneira, uma ferramenta potencial para a imunização gênica (Pontes *et al.*, 2011).

Como pode ser observado, *L. lactis* apresenta grande potencial para atuar como veículo carreador de vacinas de DNA, representando uma alternativa bastante atraente em relação à utilização das já mencionadas bactérias enteropatogênicas atenuadas. Contudo, apesar das inúmeras vantagens atribuídas às vacinas gênicas e do fato de a utilização de *L. lactis* constituir uma estratégia segura e bastante promissora para entrega das mesmas, existem algumas limitações a serem consideradas e vencidas a fim de se alcançar uma aplicação realmente eficaz desta inovadora plataforma vacinal.

Uma limitação importante ao potencial profilático das vacinas de DNA tem sido os baixos níveis de expressão gênica e imunogenicidade, observados, sobretudo, em estudos envolvendo primatas superiores e seres humanos (Nordström *et al.*, 2005; Ferrera *et al.*, 2007; Liu, 2011; Coban *et al.*, 2011). A indução de resposta imune após imunização com vacinas gênicas, por sua vez, depende primordialmente da capacidade de expressão do antígeno codificado pelo plasmídeo vacinal (Faurez *et al.*, 2010) e, para que isso aconteça, o DNA plasmídeo deve atingir o núcleo das células do indivíduo vacinado. Este processo,

no entanto, é dificultado devido à presença de numerosas barreiras intracelulares, sendo o envelope nuclear o maior obstáculo à entrada do plasmídeo vacinal no núcleo das células alvo (Lam e Dean, 2010). Assim sendo, a otimização dos vetores vacinais, visando direcioná-los mais eficientemente para o compartimento nuclear, é tema de grande importância (Miller e Dean, 2009; Faurez *et al.*, 2010).

Para tal finalidade, diversas abordagens têm sido adotadas, sendo que a inserção de uma sequência nucleotídica do vírus símio 40 (SV40, do inglês *Simian Virus 40*), denominada Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS, do inglês *DNA nuclear Targeting Sequence*) e descrita como sendo capaz de direcionar DNA exógeno ao núcleo de células eucarióticas, tem demonstrado resultados interessantes no que diz respeito ao aumento da expressão gênica a partir dos plasmídeos que a contenham (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999; Vacik *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Young, Benoit e Dean, 2003; Young, Zimmer e Dean, 2008).

Sendo assim, o presente trabalho se propôs a responder a seguinte questão: a inserção da DTS de SV40 no plasmídeo vacinal pValac, contendo a sequência codificadora da proteína GFP a ser utilizada como ORF repórter, poderia resultar em níveis mais elevados de importação nuclear deste plasmídeo, com conseqüente aumento da expressão da referida proteína?

Além disso, buscou-se também obter a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ contendo tal plasmídeo (denominado pValac::DTS::gfp), para que, uma vez verificada a capacidade de aumento da expressão gênica a partir do mesmo, esta linhagem possa ser utilizada em estudos posteriores de entrega deste vetor vacinal, *in vivo*.

Enfim, o trabalho aqui apresentado, e ainda em andamento, faz parte de uma nova linha de pesquisa que visa testar e implementar a otimização de plasmídeos vacinais, no intuito de melhorar a eficácia de novas vacinas gênicas, a serem entregues ao hospedeiro por bactérias inócuas, como é o caso de *Lactococcus lactis*, através da via de administração em mucosas.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma revisão de literatura abordando três assuntos principais: (i) as vacinas de DNA, seu mecanismo de ação, suas vantagens e suas principais vias de entrega; (ii) as Bactérias Lácticas (BL) como veículos para entrega de vacinas gênicas, especialmente no que concerne ao uso de linhagens invasivas de *Lactococcus lactis* para esta finalidade e (iii) as limitações das vacinas de DNA bem como estratégias para contorná-las, enfatizando a otimização de vetores vacinais através da inserção da DTS de SV40. Em seguida, encontram-se os objetivos do trabalho e a metodologia utilizada para seu desenvolvimento. A seguir, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos são apresentados em três partes: (i) a obtenção do plasmídeo pValac::DTS::gfp; (ii) a verificação de sua funcionalidade em células eucarióticas e (iii) a transformação do respectivo plasmídeo na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA⁺. Por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão demonstradas, seguindo-se as referências bibliográficas.

2 INTRODUÇÃO

2.1 VACINAS DE DNA

Desde o surgimento das primeiras vacinas até as formulações vacinais mais recentemente descritas, grandes áreas da ciência, tais como a microbiologia e a biologia molecular, têm demonstrado um papel crucial no desenvolvimento de novas formas de imunização, mais seguras e eficazes (Diniz e Ferreira, 2010).

Dentre as plataformas vacinais, as “vacinas de DNA”, ou “vacinas gênicas”, como também são conhecidas, representam as mais recentes formas de imunização e constituem uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas ao sistema imune. Estas vacinas consistem na administração de vetores plasmídeos contendo um cassete de expressão eucariótica, no qual sequências codificadoras de proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras são inseridas, sendo possível a síntese destas proteínas pelo próprio hospedeiro, com consequente apresentação das mesmas ao sistema imune e proteção (Gurunathan *et al.*, 2000).

2.1.1 Histórico

A primeira evidência na literatura do uso imunológico de uma molécula de DNA remonta ao ano de 1992, quando Tang, De Vit e Johnston, então pesquisadores da Universidade do Texas, observaram que a injeção de plasmídeos contendo a sequência codificadora do hormônio do crescimento humano em camundongos foi capaz de gerar anticorpos específicos contra este hormônio, sugerindo que o DNA poderia ser utilizado também para induzir respostas imunes contra doenças infecciosas (Tang, De Vit e Johnston, 1992). Naquele mesmo ano, durante a Reunião Anual de Vacinas no “*Cold Spring Harbor Laboratory*”, três outros grupos de pesquisa reportaram indução de imunidade celular e humoral em modelo murino, após a “imunização gênica”. Dois destes trabalhos comprovavam a geração de resposta imune contra o vírus influenza (Ulmer *et al.*, 1993; Fynan *et al.*, 1993) e o terceiro, contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Wang *et al.*, 1993). Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos após imunização de camundongos contra o herpesvírus bovino I (Cox, Zamb e Babiuk, 1993) e contra o vírus da raiva (Xiang *et al.*, 1994), reiterando o potencial imunogênico e protetor das vacinas de DNA.

2.1.2 Vacinas de DNA aprovadas e em ensaios clínicos

As vacinas de DNA constituem uma nova geração de produtos biotecnológicos utilizados tanto para fins profiláticos quanto para fins terapêuticos que estão começando a entrar no mercado. Os progressos nesta área resultaram no desenvolvimento e na comercialização de quatro vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário, sendo uma delas contra o vírus do Nilo Ocidental, que infecta cavalos (Davis *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2005), outra contra o vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmões (ApexIHN[®] - Novartis, 2005), uma terceira vacina terapêutica relacionada à liberação do fator de crescimento em suínos (LifeTide[®] SW 5 – VGX[™] Animal Health, 2008) e finalmente, uma vacina para tratamento de melanoma canino (ONCEPT[™] - Merial, 2010). Tais licenciamentos se apresentam como uma importante validação dessa plataforma vacinal, visto que ilustam seu potencial comercial (Kutzler e Weiner, 2008).

Com relação à utilização das vacinas de DNA em seres humanos, os resultados positivos obtidos através de estudos pré-clínicos em diferentes modelos animais, inclusive primatas, proporcionaram o acúmulo de dados sobre a eficácia e a segurança dessas formulações, permitindo o início dos testes clínicos (Silva *et al.*, 2004). Assim sendo, apesar de ainda não existirem produtos licenciados para uso humano, diversos ensaios clínicos utilizando vacinas de DNA estão sendo conduzidos, sendo que muitos destes têm se concentrado no combate à AIDS e no tratamento e prevenção de diversos tipos de câncer e doenças autoimunes (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=dna+vaccines>; acesso em out/2011). Estes testes têm demonstrado que as vacinas de DNA são bem toleradas e seguras, uma vez que não foram relatados eventos adversos significativos em vários dos estudos já concluídos (Liu e Ulmer, 2005; Liu, 2011), mas, entretanto, em relação ao seu perfil imunogênico, alguns destes testes têm reportado baixos níveis de imunogenicidade (Nordström *et al.*, 2005; Ferrera *et al.*, 2007; Liu, 2011; Coban *et al.*, 2011).

2.1.3 Estruturas dos vetores vacinais

As vacinas de DNA são compostas de vetores plasmídeos codificando proteínas imunogênicas ou imunomoduladoras. Em termos gerais, estes vetores contêm (i) uma origem de replicação procariótica, que permite a sua propagação no hospedeiro microbiano e (ii) um gene que confere resistência a um determinado antibiótico (sob controle de um promotor procariótico), necessário à seleção dos clones que possuem o plasmídeo. A região de expressão eucariótica, por sua vez, é geralmente composta por (i) um promotor viral forte e constitutivo, visando conferir um alto nível de expressão gênica nas células eucarióticas,

(ii) um sítio de clonagem múltipla, que permite a inserção da sequência codificadora de interesse, (iii) um códon de parada, para garantir a terminação correta da proteína e (iv) uma sequência sinal de poliadenilação (poli-A), necessária à estabilização do transcrito primário (Fig. 1) (Gurunathan, Klinman e Seder, 2000; Kano, Vidotto e Vidotto, 2007).

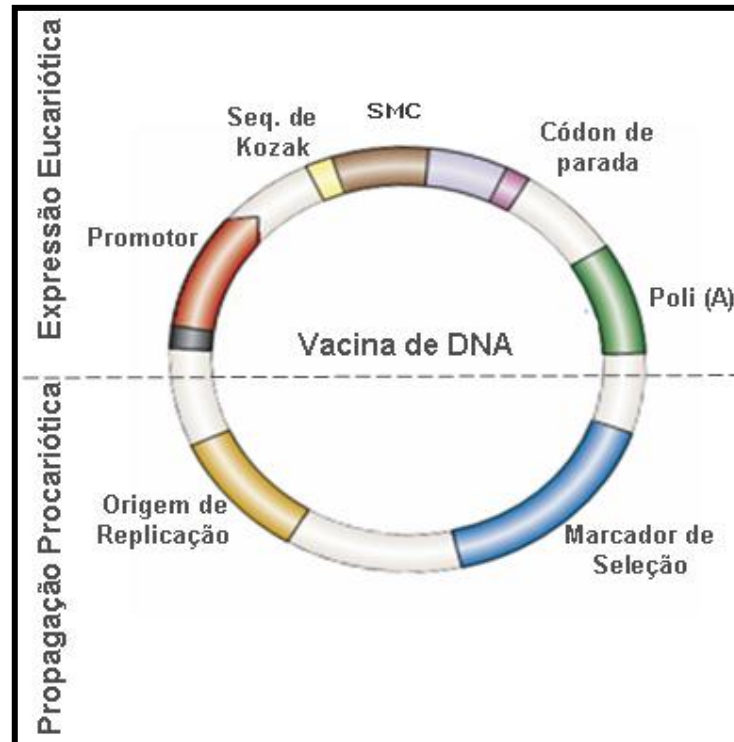


Figura 1: Representação esquemática de um plasmídeo vacinal. Na parte superior da figura encontra-se a região de expressão eucariótica, composta por (i) promotor (geralmente de origem viral), (ii) sequência de Kozak (sinalizando o *start códon*), (iii) sítio múltiplo de clonagem (SMC), (iv) códon de parada e (v) sequência sinal de poliadenilação (poli-A). Na porção inferior, observa-se a região de propagação procariótica, contendo (i) origem de replicação procariótica e (ii) marcador de seleção (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

2.1.3.1 Propagação Procariótica

No que diz respeito às origens de replicação presentes nas vacinas de DNA, atualmente a grande maioria dos vetores utilizados para este propósito é derivada dos plasmídeos pBR322 ou pUC. Estes plasmídeos contêm uma origem de replicação intimamente relacionada com a origem ColE1 de *Escherischia coli*, sendo este sistema caracterizado por permitir alta taxa de replicação do DNA plasmidiano em um curto período de tempo (Williams, Carnes e Hodgson, 2009; Ingolotti *et al.*, 2010).

Com relação aos marcadores de seleção, os quais são responsáveis pela estabilidade e manutenção dos plasmídeos vacinais na célula bacteriana, aqueles mais utilizados são genes que conferem resistência a antibióticos, sendo a resistência à canamicina a mais

difundida (Ingolotti *et al.*, 2010). No entanto, estratégias de seleção alternativas, como por exemplo a complementação auxotrófica, têm sido analisadas visando o desenvolvimento de vetores vacinais menores e mais seguros (Williams, Carnes e Hodgson, 2009).

2.1.3.2 Unidade Transcricional

Promotor

No cassete de expressão eucariótica, promotores virais tais como o do Citomegalovírus (pCMV), Rous vírus (pRSV), Símio vírus (pSV40) e Herpes simplex vírus tipo 1 (promotor da timidina quinase) têm sido frequentemente utilizados para a expressão do transgene de interesse (Becker, Noerder e Guzmán, 2008). Dentro deste grupo, o pCMV se destaca por promover altos níveis de expressão constitutiva em uma grande variedade de células mamíferas, sendo o mais usado atualmente. (Kutzler e Weiner, 2008). Além disso, a utilização de alguns promotores não-virais também vem sendo considerada e, apesar da relativa fraqueza da atividade destes promotores em relação aos seus homólogos virais, eles constituem uma possível alternativa, como o promotor do gene do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) de classe II (Vanniasinkam, Reddy e Ertl, 2006).

Transgene

As vacinas gênicas apresentam um diferencial em relação às outras vacinas, que é a possibilidade de se codificar múltiplas proteínas em uma simples construção. Assim, além do antígeno ao qual se deseja imunizar, podem, por exemplo, ser adicionados genes com funções adjuvantes, no intuito de melhorar a potência destas vacinas (Ingolotti *et al.*, 2010).

Sequência de Poliadenilação

A inclusão de um sítio de rescisão, ou sequência sinal de poliadenilação (AAUAAA), junto à extremidade 3' da sequência codificadora de interesse é essencial para a expressão eucariótica. O sinal de poliadenilação é necessário para a correta finalização da transcrição da sequência de interesse, adição da cauda poli-A e exportação do RNA mensageiro (mRNA) do núcleo para o citoplasma, desempenhando um papel importante em sua estabilidade (Kutzler e Weiner, 2008). Atualmente, a maioria dos vetores contém o sinal de poliadenilação do vírus SV40 ou do Hormônio de Crescimento Bovino (BGH, do inglês Bovine Growth Hormone). Estudos têm revelado que a sequência sinal de poliadenilação do BGH é até duas vezes mais eficiente que as demais, sendo por isso a mais comumente utilizada (Xu *et al.*, 2002).

Sequência de Kozak e códons de parada

Outra característica importante a ser considerada na construção do cassete de expressão eucariótica é a inserção de uma sequência consenso específica que circunda o *start códon*, sinalizando-o, denominada sequência de Kozak. Esta sequência é responsável pelo reconhecimento do mRNA pelos ribossomos eucarióticos, afetando assim os níveis de expressão gênica (Becker, Noerder e Guzmán, 2008). Por fim, para garantir a terminação correta da proteína, também é importante a inserção de um *stop codon* (Kutzler e Weiner, 2008).

2.1.4 Mecanismo de ação das vacinas de DNA

Os mecanismos de indução da imunidade pelas vacinas de DNA têm sido alvo de intensa investigação. Sabe-se que após a administração destas, o DNA plasmídeo é captado pelas células locais ou por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*). Uma vez no citoplasma, o vetor vacinal, utilizando a rede de microtúbulos da célula e suas proteínas motoras associadas, atinge o núcleo (Vaughan e Dean, 2006), onde a expressão do antígeno relacionado ao agente infeccioso ao qual se deseja imunizar é realizada por meio da maquinaria transcricional e traducional desta própria célula (Silva *et al.*, 2004). As APCs possuem um papel central em ativar a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Migrando para os linfonodos, elas apresentam os antígenos endógenos por moléculas de MHC de classe I, gerando ativação de linfócitos TCD8+ citotóxicos. Todavia, o antígeno produzido pelas células do indivíduo vacinado pode também atingir o meio extracelular, tanto por secreção (caso possuam sinais para exportação), quanto por lise destas células, pelos referidos linfócitos TCD8+ ativados. Uma vez no meio extracelular, o antígeno pode estimular diretamente a produção de anticorpos por linfócitos B ou ser capturado por outras APCs; neste caso, estas APCs apresentam os peptídeos resultantes do processamento antigênico via moléculas de MHC classe II, ativando linfócitos TCD4+ auxiliares (Fig. 2). Tanto respostas do tipo TH1 quanto TH2 podem ser induzidas, demonstrando o potencial desta estratégia vacinal no combate e/ou tratamento de uma ampla gama de doenças (Silva *et al.*, 2004).

A apresentação antigênica via moléculas de MHC classe I e II, com consequente ativação de linfócitos T CD8+, T CD4+ e produção de anticorpos, mimetiza o processo resultante de uma infecção natural, gerando ambas as respostas imunes humoral e celular, propriedade importantíssima que difere as vacinas de DNA de outras estratégias vacinais, tais como vacinas inativadas ou de subunidade (Oliveira, 2004).

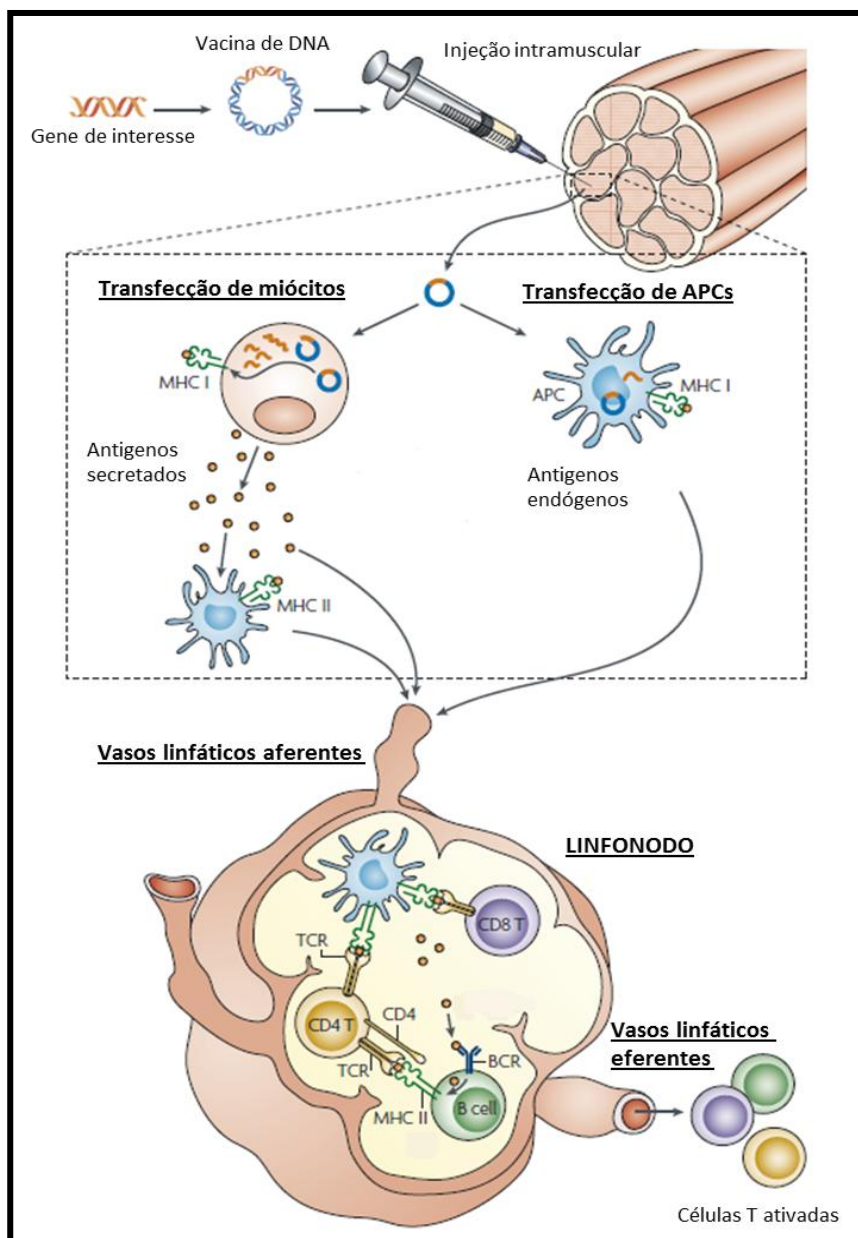


Figura 2: Representação esquemática da indução da imunidade celular e humoral por vacinas de DNA. A sequência codificadora de interesse é clonada no plasmídeo vacinal e este então é administrado ao indivíduo. O exemplo demonstra a entrega da vacina de DNA por via intramuscular. Após alcançar o núcleo de miócitos e APCs, os componentes do plasmídeo permitem a iniciação da transcrição gênica, levando à síntese de proteínas no citoplasma. Posteriormente, as APCs migram através dos vasos linfáticos aferentes para os órgãos linfóides e apresentam os peptídeos antigênicos via moléculas de MHC classe I ou II aos linfócitos T. Células TCD8+ tornam-se ativadas assim como os linfócitos TCD4+, que passam a secretar citocinas, levando à ativação de células B. Além disso, os antígenos livres são reconhecidos por imunoglobulinas expressas na superfície das células B, que, por sua vez, os apresentam novamente aos linfócitos TCD4+ auxiliares. Esse processo coordenado gera uma resposta específica contra o antígeno de interesse após ativação de células T e B que migram através dos vasos linfáticos eferentes para o local onde a vacina foi administrada (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

2.1.5 Vantagens das vacinas de DNA

As vacinas de DNA, além de serem capazes de induzir imunidade humoral e celular assim como as vacinas baseadas em patógenos atenuados, sem, contudo, apresentarem os riscos associados àquela estratégia, apresentam inúmeras outras vantagens sobre as vacinas tradicionais em termos de segurança, facilidade de fabricação, estabilidade e imunogenicidade (Tabela 1). Nestas vacinas, a síntese endógena do antígeno ocorre com características estruturais muito semelhantes à molécula nativa sintetizada pelo patógeno, criando condições para indução de respostas imunes mais efetivas (Silva *et al.*, 2004). Devido à sua estrutura simples, modificações na construção do plasmídeo vacinal podem ser feitas em um curto período de tempo e tendo em vista que as vacinas de DNA podem ser facilmente replicadas em bactérias, é possível uma produção rápida, barata, e em larga escala (Kutzler e Weiner, 2008). Além disso, diferentemente das vacinas vivas e de subunidade, as vacinas gênicas são altamente estáveis e não requerem refrigeração, característica muito favorável à sua utilização sob condições oferecidas em países em desenvolvimento (Silva *et al.*, 2004).

Outra vantagem relevante que as vacinas gênicas apresentam sobre as demais é a possibilidade de se codificar mais de um antígeno em um mesmo vetor vacinal (Capone *et al.*, 2006; Williams, Carnes e Hodgson, 2009), gerando as chamadas vacinas multigenes ou multivalentes (Gurunathan *et al.*, 2000), que possibilitam imunizações simultâneas contra vários agentes infecciosos. Cabe ainda ressaltar que as vacinas de DNA oferecem a possibilidade de ser usadas terapêuticamente (Delavallée *et al.*, 2008).

Em relação ao seu perfil de segurança, estas não apresentam riscos de causar infecções, pois os plasmídeos expressam apenas genes específicos para determinada proteína antigênica (Oliveira, 2004). Questões referentes à possibilidade de integração do plasmídeo vacinal ao DNA genômico da célula, bem como geração de auto-imunidade em resposta às vacinas de DNA tem sido levantadas, todavia, estudos realizados até o momento não têm demonstrado risco iminente de esses fenômenos ocorrerem. As vacinas de DNA que estão sendo testadas atualmente não têm apresentado evidências de integração dos plasmídeos vacinais no genoma de células hospedeiras (Temin, 1990; Kurth, 1995; Manam *et al.*, 2000; Ledwith *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2006; Sheets *et al.*, 2006). Quanto ao desenvolvimento de auto-imunidade, estudos pré-clínicos em primatas não humanos e os primeiros estudos em seres humanos não detectaram aumento de anticorpos antinucleares ou anti-DNA, não havendo, portanto, evidência convincente de seu surgimento em resposta às vacinas de DNA (Bagarazzi *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 1998; Le *et al.*, 2000; Klinman *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2000).

Tabela 1: Vantagens da utilização de vacinas de DNA (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

VANTAGENS	CARACTERÍSTICAS
Construção	Modificações no plasmídeo vacinal podem ser feitas em curto período de tempo
	Possibilidade de otimização de plasmídeos e transcritos
	Utilização dos avanços da genômica para construção da vacina
Tempo de manufatura	Rápida produção
Segurança	Incapacidade de reversão a formas virulentas, como as vacinas vivas
	Diferentemente de algumas vacinas inativadas, a eficácia não depende de tratamentos tóxicos
	Nenhum efeito adverso significativo nos ensaios clínicos realizados até o momento foi reportado
Estabilidade	Maior termo-estabilidade em relação às outras vacinas
	Maior vida útil
Mobilidade	Fácil estocagem e transporte
	Não é necessária refrigeração constante
Imunogenicidade	Indução de resposta imune celular e humoral, assim como as vacinas vivas

2.1.6 Vias de administração e sistemas carreadores de vacinas de DNA

As vias de entrega e as estratégias de administração das vacinas gênicas são aspectos de grande importância para a expressão dos antígenos de interesse e condicionamento de uma resposta imune eficaz. Existem diversas vias e formas pelas quais uma vacina de DNA pode ser administrada, sendo que a administração de DNA *in vivo* por via intramuscular tem sido a abordagem mais utilizada (Kutzler e Weiner, 2008). Entretanto, embora esse mecanismo seja um processo simples e de baixo custo, alguns inconvenientes podem limitar sua utilização, como por exemplo, a necessidade de aplicação de grandes quantidades de plasmídeo (Lowrie *et al.*, 1997), uma vez que o DNA desprotegido é exposto a nucleases que são capazes de degradá-lo, tornando-o ineficaz para induzir uma resposta imune (Júnior *et al.*, 2004). Além disso, por se tratar de uma rota invasiva, vacinas administradas parenteralmente são pouco eficientes em estimular o sistema imune associado às mucosas, sendo efetivas somente contra patógenos que penetram no organismo pela rota sistêmica (Lowrie *et al.*, 1997).

Devido à sua acessibilidade e dimensão, outra abordagem para entrega das vacinas de DNA tem sido administrá-las através da pele. A biobalística ou *gene gun* é um método de entrega epidérmica de DNA, onde as células de Langerhans e queratinócitos são diretamente transfectados pelo bombardeio de partículas de ouro revestidas com os plasmídeos de DNA (Fuller, Loudon e Schmaljohn, 2006). Outra metodologia que tem sido amplamente estudada para entrega de plasmídeos vacinais é a técnica de eletroporação ou

eletropermeabilização. A aplicação de pulsos de alta voltagem com duração de milissegundos em um tecido pode gerar poros na membrana celular, permitindo a entrada da vacina de DNA no citoplasma das células (Zaharoff *et al.*, 2002). Esta abordagem tem demonstrado resultados muito positivos no que se refere ao aumento da eficácia da entrega das vacinas gênicas e da magnitude da resposta imune gerada por elas (Widera *et al.*, 2000; Bodles-Brakhop, Heller e Draghia-Akli, 2009; Bråve *et al.*, 2011; Vasan *et al.*, 2011).

Adicionalmente, outros diferentes métodos cutâneos para a entrega das vacinas de DNA vêm sendo investigados, tais como a injeção intradérmica ou subcutânea, cujos alvos são fibroblastos e queratinócitos; o uso tópico, como o *DermaVir*, que transfeta células de Langerhans - as APCs da pele - por meio de um adesivo cutâneo (Lori, Calarota e Lisziewicz, 2007), o *Painting DNA*, que consiste em escarificar algumas camadas da pele, a fim de se obter uma transfecção mais eficiente (Watabe *et al.*, 2001) e o “*DNA tattooing*”, forma recente de administração de vacinas gênicas que se assemelha a um processo de tatuagem e que tem apresentado resultados interessantes quanto à geração de respostas imunes mais potentes (Pokorna, Rubio e Muller, 2008; van den Berg *et al.*, 2009). A nanotecnologia também vem sendo explorada para facilitar a internalização destas vacinas. Esta tecnologia é atualmente aplicada na administração de drogas, mas já está sendo considerada para a entrega de vacinas de DNA e terapia gênica (Peek, Middaugh e Berkland, 2008).

Outra possível via de administração para vacinas de DNA que não se deve deixar de mencionar são as superfícies de mucosas. A vacinação por esta via, recomendada pela Organização Mundial da Saúde por razões econômicas, logísticas e de segurança, apresenta a possibilidade de geração de ambas as respostas imunes sistêmica e de mucosas (Neutra e Kozlowski, 2006; Wells, 2011), sendo esta última particularmente interessante, haja vista que muitos patógenos invadem o organismo por esta rota. Ademais, a administração de vacinas por esta via é relativamente simples, o que permite maior aceitação por parte dos indivíduos a serem vacinados (Bahey-El-Din, Gahan e Griffin, 2010). Dentro do contexto da imunização por via de mucosas, a utilização de bactérias geneticamente modificadas representa uma alternativa promissora para a entrega dos plasmídeos vacinais (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003).

2.1.7 Bactérias na entrega de vacinas de DNA

Estudos realizados por Walter Schaffner em 1980 demonstraram que as bactérias são capazes de transferir material genético para células mamíferas, *in vitro*. Por esse motivo elas foram propostas como um novo vetor a ser utilizado para transferência de plasmídeos vacinais (Schaffner, 1980; Courvalin, Goussard e Grillot- Courvalin, 1995; Sizemore,

Branstrom e Sadoff, 1995; Vassaux *et al.*, 2006). Essa transferência ocorre quando a bactéria entra na célula eucariótica em uma vesícula primária, que logo após é fundida a um compartimento lisossômico, ocorrendo a lise bacteriana. Subseqüentemente, o DNA plasmidiano deve escapar da vesícula para o citoplasma e, em seguida, ser translocado para o núcleo da célula, para que ocorra a expressão da ORF de interesse e posterior apresentação do antígeno ao sistema imune (Figura 3) (Schoen *et al.*, 2004).

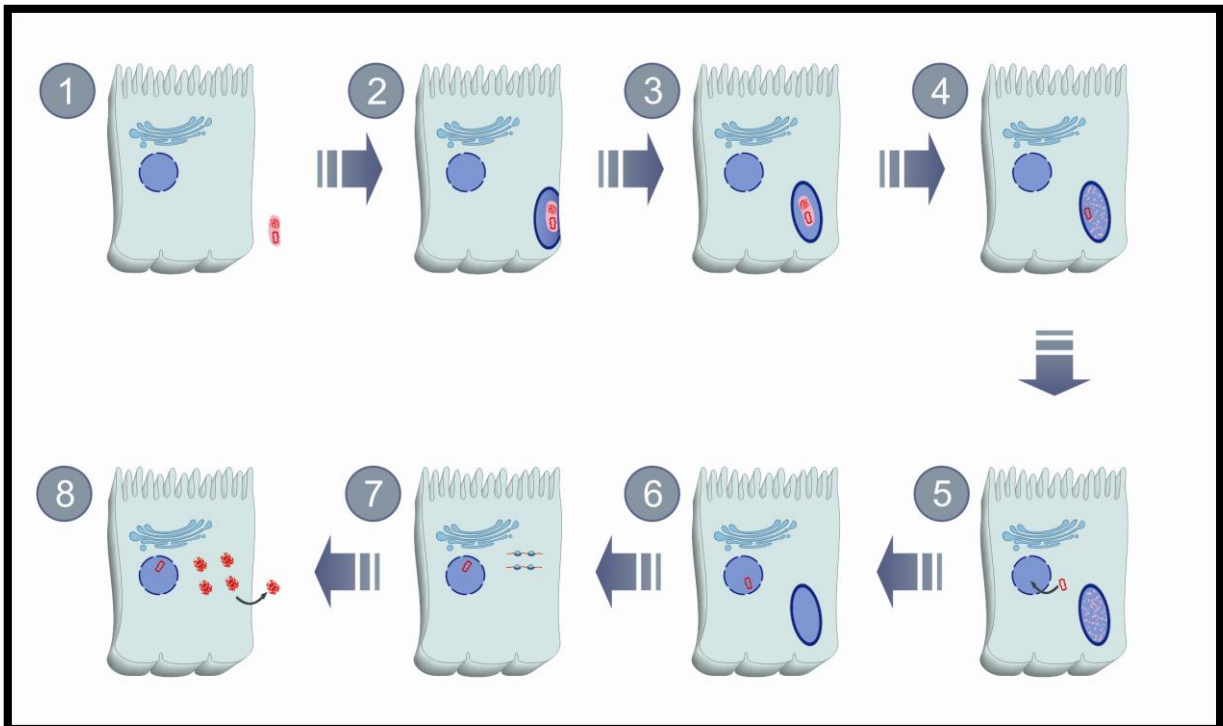


Figura 3: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica. (1) Célula eucariótica e bactéria contendo o plasmídeo vacinal; (2 e 3) Entrada da bactéria em uma vesícula primária na célula hospedeira; (4) Fusão da vesícula primária com o compartimento lisossômico e lise bacteriana; (5) Escape do plasmídeo de DNA da vesícula para o citoplasma; (6) a vacina de DNA alcança o núcleo da célula; (7 e 8) Transcrição e tradução do antígeno de interesse e apresentação deste ao sistema imune (Adaptado de Pontes *et al.*, 2011).

Um aspecto importante da “bactoinfecção” é a possibilidade de se imunizar indivíduos pelas mucosas oral e nasal, que representam a primeira linha de defesa contra microorganismos que utilizam esse meio de entrada (Izadpanah *et al.*, 2001). Outra vantagem deste sistema de entrega consiste no fato de que as bactérias são capazes de acomodar plasmídeos de grande tamanho, o que possibilita a inserção de múltiplas ORFs de interesse, além de protegê-los contra degradação por nucleases (Hoebe, Janssen e Beutler, 2004). Além disso, as bactérias podem atuar como adjuvantes devido à presença de moléculas em sua estrutura, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), capazes de

modular respostas imunes inatas, promovendo, como consequência, uma resposta imune adaptativa eficiente e duradoura (Hoebe, Janssen e Beutler, 2004). Por fim, este sistema é tido como pouco dispendioso, dada a facilidade de cultivo das bactérias e porque a perpetuação do plasmídeo vacinal se dá pelo simples crescimento da cultura bacteriana, sendo assim, etapas de purificação do plasmídeo tornam-se desnecessárias (Schoen *et al.*, 2004).

Atualmente, as bactérias utilizadas para entrega de vacinas de DNA são, em sua maioria, enteropatogênicas atenuadas, dentre as quais pode-se citar *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* (Daudel, Weidinger e Spreng, 2007). Seu uso é interessante uma vez que, mesmo atenuadas, estas são capazes de interagir com a superfície das mucosas e infectar células mamíferas, facilitando a introdução do plasmídeo vacinal (Becker, Noerder e Gúzman, 2008). Tais bactérias têm sido empregadas como transportadoras de plasmídeo de DNA para profilaxia de várias doenças infecciosas e tumores (Schoen *et al.*, 2004), contudo, o risco de reversão a seu fenótipo patogênico existe, fato que deve ser levado em consideração principalmente quando se trata de sua administração a crianças e indivíduos imunocomprometidos (Dunham, 2002). Sendo assim, alguns grupos de pesquisa, visando estratégias mais seguras para a entrega das vacinas de DNA, têm explorado o potencial de bactérias não patogênicas para esta finalidade, cenário no qual as bactérias lácticas se destacam como alternativa promissora (Wells e Mercenier, 2008).

2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

2.2.1 Características gerais

As bactérias lácticas (BL) constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, microaerófilos, não formadores de esporos e não móveis, capazes de converterem açúcares (hexoses) em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007). Atualmente, trinta e dois gêneros bacterianos com porcentagem de G+C no genoma inferior a 55%, compõem o grupo das BL (König e Fröhlich, 2009), dentre os quais estão incluídos os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, e *Lactobacillus*, sendo este último o maior representante do grupo, contendo cerca de 80 espécies (Carr, Chill e Maida, 2002).

Por serem utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos, a maior parte destas bactérias é considerada segura para consumo humano, possuindo o status “GRAS” (do inglês, *Generally Recognized As Safe*) (van de Guchte *et al.*, 2006).

Na indústria alimentícia, as BL são utilizadas para a fermentação de alimentos e bebidas, formação do sabor (Urbach, 1995), preservação (Stiles, 1996), produção de suplementos ou aditivos (Hugenholtz *et al.*, 2002), bacteriocinas (De Vuyst e Leroy, 2007) e exopolissacarídeos (Cerning, 1990; Welmam e Maddox 2003). Elas também podem ser utilizadas para a produção de consideráveis volumes de químicos, como ácido láctico (Kwon *et al.*, 2001), vitamina B (Taranto *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2004) e açúcares de baixa caloria (Taguchi *et al.*, 2008). A estes microrganismos ainda é atribuído um importante papel na manutenção da saúde e na prevenção de infecções (Reid *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2005), sendo alguns destes referidos como probióticos, ou seja, "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro" (Sanders, 2003).

Além de sua ampla utilização na indústria de alimentos, as bactérias lácticas apresentam grande potencial para serem utilizadas como "usinas celulares" para produção de biomoléculas, sendo que muitas proteínas de interesse médico e biotecnológico já foram produzidas por elas, tais como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán, Corthier e Langella, 2004). Atualmente, uma nova aplicação para as BL vem sendo considerada, a qual consiste na sua utilização como vetores vacinais para apresentação de antígenos ao sistema imune ou entrega de proteínas terapêuticas ao indivíduo, bem como sua utilização para entrega de vacinas de DNA (Pontes *et al.*, 2011), estando esta última utilização potencial sob extensa investigação, utilizando principalmente a bactéria láctica modelo *Lactococcus lactis*.

2.2.2 *Lactococcus lactis* como veículo carreador para entrega de vacinas gênicas

Dentre todas as bactérias lácticas, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como microorganismo modelo no estudo das mesmas, não só por sua importância econômica, mas também devido ao fato de ser um microrganismo de fácil manipulação, possuir o status "GRAS", ter sido a primeira BL cujo genoma foi sequenciado (Bolotin *et al.*, 2001) e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (de Vos, 1999; Nouaille *et al.*, 2003).

Este microorganismo apresenta diversas características que o torna um vetor interessante para imunização, sobretudo por via oral, como, por exemplo, resistir ao ambiente ácido do estômago, sendo capaz de sobreviver no trato gastrointestinal. Outra propriedade atraente de *L. lactis* é que ele não possui lipopolissacarídeos (LPS) em sua parede celular, o que elimina os riscos de choque por endotoxinas. Por fim, esta bactéria é

pouco imunogênica, ao contrário dos microrganismos patogênicos, e por esse motivo, pode ser continuamente utilizada em programas de imunização (Mercenier, Muller-Alouf e Grangette, 2000). Desta forma, diversos grupos de pesquisa têm explorado o potencial vacinal de *L. lactis*, sendo que atualmente os estudos envolvendo este microorganismo têm se concentrado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas de DNA.

Guimarães e colaboradores demonstraram que células epiteliais da linhagem Caco-2 co-cultivadas com linhagens de *L. Lactis* nativas contendo um cassete de expressão eucariótica da proteína β -lactoglobulina bovina (BLG), o maior alérgeno do leite de vaca, foram capazes de expressar e secretar esta proteína (Guimarães *et al.*, 2006). Mais tarde, camundongos foram imunizados com essa mesma linhagem e a proteína BLG foi detectada na membrana epitelial do intestino delgado de 53% destes animais (Chatel *et al.*, 2008). Uma resposta imunológica BLG específica, baixa e transitória do tipo Th1 foi obtida e os camundongos tornaram-se protegidos após sensibilizações com o alérgeno. Entretanto, apesar de interessante, observou-se baixa taxa de transferência de DNA *in vivo*. Esse fato muito provavelmente deve-se ao *status* não patogênico de *L. lactis*, o que impede sua persistência no trato gastrointestinal, dificultando sua interação com células epiteliais do hospedeiro (Chatel *et al.*, 2008).

Assim, uma estratégia adotada para aumentar a eficiência de entrega destes vetores foi o desenvolvimento de linhagens de *L. lactis* invasivas, uma das quais, a linhagem de *L. lactis* expressando o gene da internalina A (*inIA*) de *Listeria monocytogenes* (Guimarães *et al.*, 2005). A Internalina A é uma proteína de 84 kDa que fica ancorada à parede celular da bactéria, mediando sua entrada em células epiteliais mamíferas por se ligar à E-caderinas presentes nas mesmas (Gaillard *et al.*, 1991; Lebrun *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a linhagem *L. lactis inIA*⁺ foi internalizada por células humanas epiteliais *in vitro* mais eficientemente que a linhagem não invasiva. O mesmo resultado foi observado *in vivo* após sua administração oral em porcos-da-índia. Além disso, essa internalização promoveu a entrega de plasmídeos contendo a ORF da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês Green Fluorescent Protein), levando à produção da mesma nos animais (Guimarães *et al.*, 2005).

Os resultados mencionados acima foram obtidos a partir da utilização de um grande plasmídeo, chamado pLIG (10 kb), fruto da co-integração de dois replicons: um de *E. coli* e outro de *L. Lactis*, sendo que após diversas tentativas de se inserir outras sequências codificadoras neste plasmídeo, foi verificado que sua estrutura e tamanho tornavam os procedimentos de clonagem e transformação muito difíceis (Guimarães *et al.*, 2005). Dessa maneira, um novo plasmídeo, de menor tamanho (3742 pb), denominado pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria), foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovírus (pCMV), (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) sequência de

poliadenilação do Hormônio de Crescimento Bovino (BGH poli-A), (iv) origens de replicação tanto para *E. Coli* quanto para *L. lactis* e (iv) um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. Além disso, para verificação de sua funcionalidade, a ORF da proteína repórter GFP foi inserida nesse vetor, dando origem ao pValac::*gfp* (Guimarães *et al.*, 2009). Devido ao seu pequeno tamanho, o pValac permite a clonagem de grandes fragmentos gênicos em sua estrutura, representando, dessa maneira, uma potencial ferramenta promissora para a imunização gênica (Pontes *et al.*, 2011).

Contudo, embora atraente, a utilização experimental de *L. lactis inIA*⁺ em camundongos apresentou uma grande limitação: a Internalina A não interage com a E-caderina murina. Dessa forma, os estudos com esta linhagem seriam possíveis somente em porcos-da-índia ou em camundongos transgênicos expressando a E-caderina humana (Lecuit *et al.*, 2001), fato que tornaria os procedimentos *in vivo* muito dispendiosos. Por esse motivo, uma nova linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína A de ligação à Fibronectina (FnBPA, do inglês *Fibronectin-Binding Protein A*) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi testada com o objetivo de melhorar a entrega de DNA às células mamíferas (Innocentin *et al.*, 2009). A proteína FnBPA medeia a adesão de *S. aureus* ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000), portanto, sua utilização poderia facilitar a entrega dos plasmídeos vacinais. Resultados *in vitro* revelaram que a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺, transformada com o plasmídeo pValac::*gfp*, foi capaz de invadir células epiteliais humanas da linhagem Caco-2 de maneira comparável à observada em *L. lactis inIA*⁺ e mais eficiente que a linhagem não invasiva e, por fim, entregar mais DNA àquelas células (Innocentin *et al.*, 2009).

Como pode ser constatado, *L. lactis* apresenta grande potencial para atuar como veículo carreador de vacinas de DNA, representando uma alternativa bastante atraente em relação à utilização das já mencionadas bactérias enteropatogênicas atenuadas. Contudo, apesar das inúmeras vantagens atribuídas às vacinas de DNA, até aqui relatadas, e do fato de a utilização de *L. lactis* constituir uma estratégia segura e bastante promissora para entrega destas vacinas, existem limitações a serem consideradas e vencidas a fim de se alcançar uma aplicação realmente eficaz desta inovadora plataforma vacinal.

2.3 LIMITAÇÕES DAS VACINAS DE DNA

Uma limitação importante ao potencial profilático das vacinas de DNA tem sido os baixos níveis de expressão gênica e imunogenicidade, observados, sobretudo, em estudos envolvendo primatas superiores e seres humanos (Nordström *et al.*, 2005; Ferrera *et al.*, 2007; Liu, 2011; Coban *et al.*, 2011). A indução de resposta imune após imunização com

vacinas gênicas, por sua vez, depende primordialmente da capacidade de expressão do antígeno codificado pelo plasmídeo vacinal (Faurez *et al.*, 2010) e, para que isso aconteça, o DNA plasmídeo deve atingir o núcleo das células do indivíduo vacinado. Este é um processo indispensável ao contato do gene de interesse com a maquinaria transcricional da célula e sua expressão (Prasad e Hao, 2005) que, entretanto, é dificultado devido às numerosas barreiras celulares existentes (Lam e Dean, 2010).

2.3.1 Obstáculos intracelulares a serem transpostos por uma vacina gênica

Inicialmente, a transposição da membrana plasmática pelo plasmídeo vacinal pode se constituir num entrave em protocolos cuja entrega gênica não seja feita diretamente ao citoplasma das células, dada a densa barreira representada pela matriz extracelular e a repulsão de cargas entre a membrana lipídica e o vetor vacinal (Miller e Dean, 2009). Uma vez no interior das células, os plasmídeos vacinais aprisionados dentro de membranas endolisosomais devem ser liberados no citosol, não sendo ainda bem compreendido, entretanto, como este processo ocorre (Faurez *et al.*, 2010). Livres no citoplasma, os vetores vacinais podem ainda ser alvos de degradação por nucleases citosólicas em pouco tempo, o que demonstra a necessidade de eles rapidamente atingirem o núcleo celular, processo que mais uma vez é dificultado pela complexa rede do citoesqueleto (Lechardeur *et al.*, 1999). Por fim, os plasmídeos vacinais devem ser capazes de atravessar o envelope nuclear para terem acesso ao interior deste compartimento, processo conhecido como importação nuclear e imprescindível à expressão do antígeno de interesse (Fig. 4) (Prasad e Hao, 2005).

Estudos distintos demonstraram que DNAs plasmídeos injetados no citoplasma de determinados tipos celulares alcançaram uma expressão gênica muito pequena em comparação aos níveis de expressão alcançados quando estes mesmos plasmídeos foram injetados diretamente no núcleo das células; resultados estes que forneceram evidências de que o envelope nuclear constitui o obstáculo limitante para uma transferência gênica bem sucedida (Capecchi, 1980; Graessman e Graessman, 1986; Mirzayans, Remy e Malcom, 1992; Zabner *et al.*, 1995).

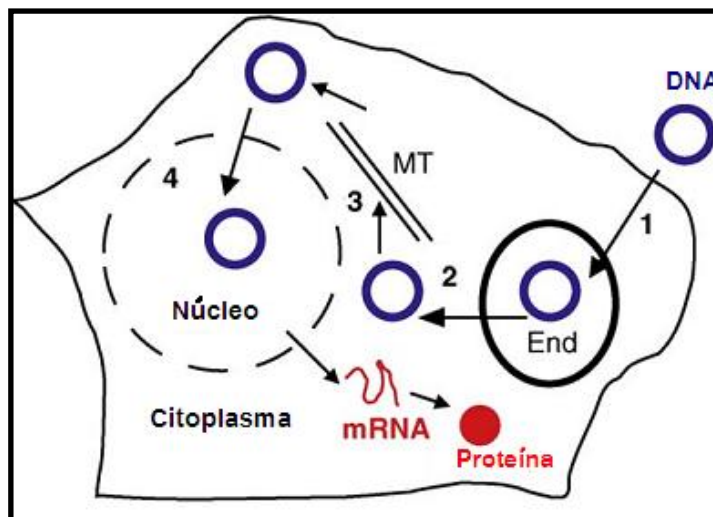


Figura 4: Representação esquemática das barreiras celulares à importação nuclear de plasmídeos vacinais. (1) Membrana plasmática; (2) Escape endossomal; (3) Migração pela densa rede do citoesqueleto citoplasmático (4) Envelope nuclear (Adaptado de Pichon, Billiet e Midoux, 2010).

2.3.2 Acesso da vacina de DNA ao interior do compartimento nuclear

Nos últimos anos, os mecanismos subjacentes à importação nuclear de DNA plasmideano, bem como métodos para otimizar sua entrega e expressão, baseados na exploração destes mecanismos, têm sido descritos (Lam e Dean, 2010).

Sabe-se que o envelope nuclear, mais especificamente estruturas protéicas constituintes deste envoltório, conhecidas como complexos do poro nuclear (NPCs, do inglês *Nuclear Pore Complexes*), regulam o transporte de macromoléculas entre citoplasma e núcleo (Faurez *et al.*, 2010). Os NPCs permitem que moléculas menores que 40 kDa ou fragmentos de DNA de até 250 pb se difundam passivamente para o interior do núcleo, enquanto macromoléculas maiores, como é o caso dos vetores vacinais, têm acesso restrito a este compartimento (Lechardeur e Lukacs, 2006; Lange *et al.*, 2007).

No caso de células que se encontram em divisão celular, altos níveis de transfecção têm sido observados, sugerindo que uma segunda via de acesso ao núcleo para estes plasmídeos seria preferencialmente após ruptura do envelope nuclear, durante a mitose. (Fasbender *et al.*, 1997; Mortimer *et al.*, 1999; Brunner *et al.*, 2000). Contudo, mesmo na ausência de divisão celular, plasmídeos vacinais podem ter acesso a este compartimento, apesar de a eficiência de transfecção nestas células ser geralmente muito menor do que naquelas em processo de divisão (Lam e Dean, 2010).

Em células em não divisão, a inibição da importação nuclear de plasmídeos por depleção de energia e por agentes que obstruem os NPCs, situação na qual a importação nuclear de proteínas destinadas ao núcleo também é inibida, sugere um terceiro mecanismo

de importação nuclear, no qual o DNA exógeno utiliza uma via similar àquela utilizada por estas proteínas para transpor o envelope nuclear, ou seja, uma importação mediada por NPCs, dependente de sinais para localização nuclear e de energia (Dean, 1997).

Basicamente esse tipo de transporte nuclear se dá quando proteínas destinadas ao núcleo celular, as quais contêm sequências relativamente curtas de aminoácidos básicos em sua superfície, denominadas sinais de localização nuclear (NLSs, do inglês *Nuclear Localization Signals*), se ligam a receptores específicos nos vetores plasmídeos. Estes NLSs, por sua vez, são reconhecidos e ligados por outra classe de proteínas efetoras de transporte nuclear, conhecidas como carioferinas ou importinas, e então todo este complexo é direcionado para núcleo, atravessado o envelope nuclear através dos NPCs, num processo dependente de energia (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2009).

2.3.3 Otimização de vetores

Considerando que a geração de resposta imune a partir de imunização com vacinas de DNA dependa, em primeira instância, da capacidade dos plasmídeos vacinais de alcançarem o núcleo das células de um indivíduo vacinado para expressão do antígeno de interesse, a otimização destes vetores visando direcioná-los mais eficientemente para este compartimento celular é muito importante (Miller e Dean, 2009; Faurez *et al.*, 2010).

As abordagens para esta finalidade incluem modificações dos plasmídeos através de sua complexação com NLSs (Sebestyén *et al.*, 1998; Ciolina *et al.*, 1999), glicocorticóides sintéticos (Rebuffatt *et al.*, 2001; Rebuffat *et al.*, 2002), importinas recombinantes (Nagasaki *et al.*, 2005), além da inserção, nestes plasmídeos, de sequências nucleotídicas conhecidas como sequências de endereçamento nuclear (Dean, 1997; Langle-Rouault *et al.*, 1998; Vacik *et al.*, 1999; Mesika *et al.*, 2001; Vaysse *et al.*, 2004; Funabashi *et al.*, 2010).

A despeito de algumas das primeiras metodologias mencionadas terem demonstrado resultados interessantes no que se refere ao aumento dos níveis de importação nuclear de plasmídeos e expressão gênica, a abordagem de inclusão de sequências de endereçamento nuclear aos DNAs plasmídeos tem se mostrado particularmente interessante, uma vez que, ao contrário do que acontece nas outras técnicas, neste método não são incorporados aos vetores peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes, evitando, por conseguinte, a geração de respostas inflamatórias no hospedeiro (Zhou *et al.*, 2007). Além disso, esta técnica não requer as etapas relativamente complicadas para construção dos vetores, como as observadas nas outras metodologias.

2.3.3.1 Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40

A primeira demonstração de que a inserção de sequências de endereçamento nuclear em vetores não virais poderia ser utilizada para melhorar seus níveis de entrega ao núcleo de células em não divisão visando protocolos de terapia gênica/vacinas de DNA mais bem sucedidos, foi apresentada por Dean, em 1997 (Dean, 1997). Este pesquisador partiu do pressuposto de que a maioria dos vetores utilizados para estudos de expressão eucariótica continham sequências nucleotídicas advindas do genoma do vírus SV40, e da constatação de que, quando microinjetado no citoplasma de células eucarióticas, o genoma deste vírus, livre de qualquer proteína, apresentava uma localização nuclear dentro de poucas horas.

Procurando elucidar qual seria a sequência responsável por mediar essa translocação nuclear, Dean clonou algumas regiões do DNA de SV40 em vetores plasmídeos e realizou experimentos de microinjeção citoplasmática em diversas linhagens celulares, as quais não estavam sofrendo processo de divisão. Seguindo a localização subcelular de suas construções através de hibridização *in situ*, ele concluiu que se tratava de uma região de 372 pb, a qual engloba a origem de replicação, os promotores *early* e *later* e a região *enhancer* do vírus, composta por 2 repetições *em tandem* de 72 pb (Fig.5). Posteriormente, foi demonstrado que a maioria da atividade de importação nuclear residia na região *enhancer* desta sequência e que esta atividade independia da orientação ou posição em que a referida sequência fosse inserida nos plasmídeos (Dean *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2001). Dessa forma, foram apresentadas evidências de que a importação nuclear de vetores plasmídeos em células que não estavam submetidas a processos de divisão celular seria um processo sequência-específico.

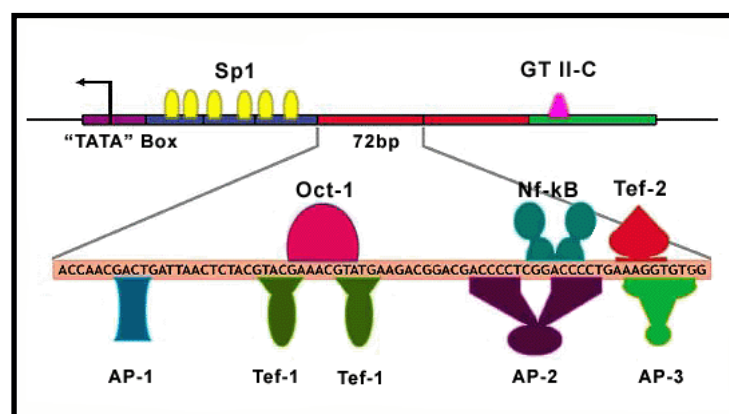


Figura 5: Representação esquemática da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40. No detalhe, ampliação de uma das sequências de 72 pb que compõem a região *enhancer*. Destacados, os sítios de ligação para os Fatores de Transcrição. Ilustração obtida a partir do *website* do Laboratório de David A. Dean, Universidade de Rochester. (http://www.urmc.rochester.edu/labs/Dean-Lab/projects/nuclear_targeting_of_plasmids_and_protein-dna_complexes; acesso em out/2011).

Considerando que essa sequência de endereçamento nuclear (DTS, do inglês *DNA nuclear Targeting Sequence*), termo cunhado pelo próprio Dean, possui sítios de ligação para vários fatores de transcrição, tais como SP1, AP1, Oct-1, e NFκB (Jones, Rigby e Ziff, 1988), foi proposto o mecanismo pelo qual o vetor plasmídeo que possuísse essa sequência fosse endereçado e atravessasse o envelope nuclear. Tal mecanismo implica ligação dos fatores de transcrição, (os quais contêm NLSs) aos seus respectivos sítios de ligação presentes na DTS, sendo este complexo “DNA-proteína” ligado por importinas, as quais medeiam o transporte deste complexo em direção ao núcleo celular e a transposição da membrana que o envolve (Fig. 6) (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2009).

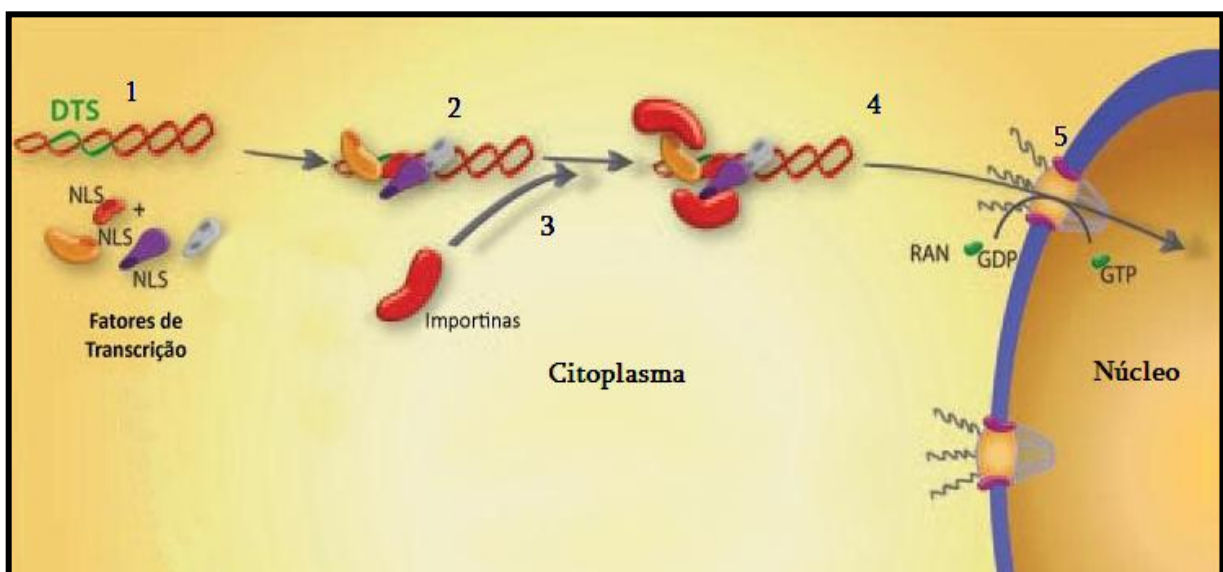


Figura 6: Modelo de importação nuclear de plasmídeos vacinais que possuem a DTS de SV40. A DTS de SV40 apresenta sítios de ligação para muitas proteínas de uma classe conhecida como Fatores de Transcrição. Estes fatores de transcrição, por sua vez, contêm Sinais de Localização Nuclear (NLSs), para que possam ser direcionados ao núcleo da célula, onde desempenham sua função. Um plasmídeo que contenha a DTS de SV40 (1) é, então, alvo de ligação por estes fatores de transcrição (2), que com seus NLSs interagindo com membros de uma segunda classe de proteínas, conhecidas como importinas, (3) permitem o transporte deste plasmídeo em direção ao núcleo (4) e sua entrada no interior do mesmo, através dos complexos do poro nuclear (NPCs), num processo dependente de energia (5) (Adaptado de Lam e Dean, 2010).

A partir da descrição da DTS de SV40, estudos subsequentes demonstraram que esta sequência foi capaz de aumentar os níveis de importação nuclear e de expressão gênica tanto *in vitro* (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999; Vacik *et al.*, 1999), quanto *in vivo* (Li *et al.*, 2001; Young, Benoit e Dean, 2003; Young, Zimmer e Dean, 2008), a partir de plasmídeos nos quais ela foi inserida. Todavia, sob condições específicas, outros pesquisadores não reportaram tais benefícios em seus estudos (Prasad e Hao, 2005; Sacramento *et al.*, 2010; van Gaal *et al.*, 2011).

Neste contexto e diante da iminente necessidade de se desenvolver formas mais seguras e eficientes de entrega das vacinas de DNA, bem como vetores vacinais mais aptos a superar as diversas barreiras celulares existentes, o presente trabalho se propôs a responder à questão de se a inserção da DTS de SV40 no plasmídeo vacinal pValac, a ser entregue especificamente por uma linhagem invasiva *L. lactis*, poderia resultar em níveis mais altos de importação nuclear e, conseqüentemente, de expressão gênica. Para tanto, foram traçados objetivos e metodologias, os quais se encontram apresentados nas seções subsequentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construção de uma versão do plasmídeo pValac::*gfp* contendo a Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 e avaliação de sua funcionalidade, *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Clonagem da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::*gfp*;
- ✓ Confirmação da construção pValac::*DTS::gfp* através das técnicas de PCR, digestão enzimática e sequenciamento;
- ✓ Transfecção de células mamíferas com o referido plasmídeo e verificação de sua funcionalidade através de Microscopia de Fluorescência e RT-PCR;
- ✓ Comparação da expressão da proteína GFP por células mamíferas transfectadas com os plasmídeos pValac::*DTS::gfp* e pValac::*gfp*, através de Citometria de Fluxo;
- ✓ Obtenção da linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::*DTS::gfp*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados

Linhagem	Características	Fonte
<i>Escherichia coli</i> TG1	[(supE, hsd, Δ5, thi, Δlac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZΔ M15)]	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac::gfp	(<i>E. Coli</i> TG1 portando o plasmídeo pValac::gfp, Cm ^r) ^a	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac::DTS::gfp	(<i>E. Coli</i> TG1 portando o plasmídeo pValacDTS:gfp, Cm ^r)	Este trabalho
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA ⁺	(<i>L. lactis</i> MG1363 portando o plasmídeo pOri23::fnbpA, Ery ^r) ^b	Que <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactococcus lactis</i> FnBPA ⁺ pValac::DTS::gfp	(<i>L. lactis</i> MG1363 portando os plasmídeos pOri23::fnbpA, Ery ^r e pValac::DTS::gfp, Cm ^r)	Este trabalho
Plasmídeo	Características	Fonte
pUC19	(ori ColE1/Amp ^r) ^c	Invitrogen
pJ204	(pUC/ Kan ^r /DTS) ^d	DNA 2.0
pValac::gfp	(pCMV/Cm ^r /RepA/RepC/gfp) ^e	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
pValac::DTS::gfp	(pCMV/ Cm ^r / RepA/RepC/gfp/DTS) ^f	Este trabalho
pOri23-fnbA	(fnbpA/ori ColE1/P23/Ery ^r) ^g	Que <i>et al.</i> , 2001

^{a/b} Linhagens de *E. coli* e *L. lactis* pertencentes ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com o grupo do Dr. Philippe Langella, do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, França).

^c ori ColE1: origem de replicação; Amp^r: gene que confere resistência à ampicilina.

^d pJ204: pUC: origem de replicação; Km^r: gene que confere resistência à canamicina; DTS: Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40.

^e pCMV: promotor do citomegalovírus; Cm^r: gene que confere resistência ao cloranfenicol; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; gfp: sequência codificadora da proteína verde fluorescente.

^f pCMV: promotor do citomegalovírus; Cm^r: gene que confere resistência ao cloranfenicol; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; gfp: sequência codificadora da proteína verde fluorescente; DTS: Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40.

^gfnbpA: sequência codificadora da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; ori ColE1: origem de replicação; P23: promotor cromossômico de *L. lactis* 1363; Ery^r: gene que confere resistência à eritromicina.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação, à 37°C, por um período de 18 horas e, quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Cm) ou 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp). Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido à 37°C por 18 horas e em seguida, as culturas foram diluídas (1:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

Já as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli) à 30°C, sem agitação, por um período de 20 horas, e quando necessário, o meio foi suplementado tanto com 5 µg/mL de eritromicina (Ery), quanto com 5 µg/mL de Cm e 2,5 µg/mL de Ery. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio líquido à 30°C por 20 horas, e em seguida, as culturas foram diluídas (1:4) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

Meios e soluções:

Luria-Bertani (LB): 25 g de meio LB (Accumedia®) foram pesados e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume para 1L. Para preparo de meio sólido, 1L de meio LB líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Himedia®). Os meios foram esterilizados por autoclavação à 121°C, durante 15 minutos. Composição: digestão enzimática de caseína 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 10 g/L; pH 7,3 ± 0,2 à 25°C.

M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli): 21 g de meio de cultivo M17 (Fluka Analytical® Sigma) foram pesados e dissolvidos em água destilada, completando-se o volume para 250 mL, sendo que o meio ficou concentrado 2X. A solução de sacarose foi preparada dissolvendo-se 85,5g desta em água destilada até completar-se 250 mL, resultando em uma solução 1M. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterilizados, separadamente, por autoclavação à 121°C durante 15 minutos; a glicose 50%, por sua vez, foi preparada dissolvendo-se 50g de glicose anidra em água destilada q.s.p 100 mL, sendo esterilizada utilizando-se um filtro de 0,22 µm. Em capela de fluxo laminar, o meio M17, a solução de sacarose e 5mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M e Glicose 0,5% (M17-Sac-Gli). Composição: triptona 2,5g/L, peptona de carne 2,5g/L; peptona de soja 5 g/L; extrato de levedura 2,5g/L; extrato de carne 5 g/L; glicerofosfato de sódio 19 g/L; sulfato de magnésio 0,25g/L; ácido ascórbico 0,5g/L; lactose 5 g/L; pH 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Cloranfenicol (10 mg/mL): 100 mg de cloranfenicol foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada, com o auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

Ampicilina (100 mg/mL): 1000 mg de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura e a solução foi esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

Eritromicina (50 mg/mL): 500 mg de eritromicina foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

Glicerol (80%): 80 mL de glicerina foram diluídos em 20 mL de água ultrapura e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

4.2 MANIPULAÇÃO DO DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmídeos foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), com algumas modificações especificadas junto aos métodos e/ou segundo recomendações dos fabricantes dos *kits*. A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também por leitura em espectrofotômetro *NanoDrop*[®] 1000 v3.5.2 (Thermo Fisher Scientific) observando-se as razões de absorbância 260 nm/ 280 nm . As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes. A sequência nucleotídica do inserto foi confirmada através de sequenciamento (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977). Os pares de iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Primers utilizados neste trabalho

Identificação	Seqüência nucleotídica	Tamanho do fragmento amplificado
DTS F	5'CGAGATCTGGAATAGCTCAGAGGCCGA3'	322 pb
DTS R	5'CGAGATCTGGTACCTTCTGAGGCGGAA3'	
Val F	5'GCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGG3'	900 pb
Val R	5'GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG3'	
GAPDH F	5' TCACCACCATGGAGAAGGC 3'	168 pb
GAPDH R	5' GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA 3'	
GFP int F	5'TGACCCTGAAGTTCATCTGCACAA3'	127 pb
GFP int R	5'AAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG3'	
FnBPA F	5' TCAGCTATTGATATCGATTA 3'	807 pb
FnBPA R	5' CAACACTATTGTGTCCACCG 3'	

F: oligonucleotídeo senso ou “forward”; R: oligonucleotídeo anti-senso ou “reverse”. Destacado, em cinza, o sítio de restrição para a enzima *Bgl*II.

4.3 RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose, da seguinte maneira: ao DNA foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi resolvido em gel de agarose à 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo. As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador *MultiDoc-It Digital Imaging System* (UVP), onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica *Doc-It® LS Image Acquisition Software* (UVP). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Soluções

Brometo de etídio: Solução estoque a 5mg/mL; Utilizou-se a 0,5 µg/mL.

TBE (0,5X): 100 mL de TBE 5X (54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 - 8,5; água destilada q.s.p 1L) em água destilada q.s.p 1L.

Tampão de amostra: Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

4.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pValac::DTS::gfp

4.4.1 Confeção de *Escherichia coli* eletrocompetente

Para confecção de células de *E. coli* eletrocompetentes, 100 µL de uma cultura de *E. coli* TG1 foram inoculados em 5 mL de meio LB sem antibiótico e este inóculo foi incubado à 37°C, sob agitação, por um período de 18 horas. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 3 mL dessa cultura foi inoculada em 300 mL de meio LB sem antibiótico e incubada à 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a DO desejada, a cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos, redistribuída em seis tubos tipo *falcon*, contendo 50 mL de cultura em cada, e estes foram centrifugados a 4.000 rotações por minuto (rpm), durante 20 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi então descartado e se seguiu a lavagem e ressuspensão do sedimento celular adicionando a cada tubo 40 mL de uma solução estéril e gelada de glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais três vezes e após a última lavagem, o sedimento celular unificado foi ressuspensão em 1 mL da solução de glicerol 10%, sendo alíquotas de 100 µL estocadas à -80°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota das células eletrocompetentes foi descongelada em gelo durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 ng do plasmídeo pUC19 (Amp^r) e a mistura de células eletrocompetentes e DNA foi transferida para cubetas de eletroporação (0,2 cm; BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, utilizando-se o eletroporador *GenePulser Xcell™* (BIO-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB à 37°C e estas foram incubadas também à 37°C, sem agitação, por duas horas. Em seguida, diluições de 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} foram semeadas em placas contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e

mantidas em estufa à 37°C durante 18 horas. Ao final, foram obtidas 5×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por micrograma de DNA.

Soluções

Glicerol (10%): 100 mL de glicerina foram diluídos em 900 mL de água destilada e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

4.4.2 Amplificação da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40

4.4.2.1 Eluição do plasmídeo pJ204

O plasmídeo pJ204, sintetizado pela empresa norte-americana DNA 2.0 Inc., o qual contém a sequência nucleotídica de 372 pb referente à DTS do vírus SV40, foi recebido depositado em um papel filtro circular. Este papel foi colocado sob uma superfície limpa e estéril e a ele foram adicionados 100 µL de água ultrapura. Passados 2 minutos de incubação à temperatura ambiente, o papel filtro foi transferido para um microtubo de 0,5 mL contendo um orifício ao fundo e o mesmo foi colocado dentro de outro microtubo, de 1,5 mL. Este sistema foi centrifugado a 14.000 rpm durante 1 minuto e o DNA foi então recuperado.

4.4.2.2 Amplificação da DTS de SV40

O isolamento do fragmento de DNA correspondente à DTS de SV40 se deu através de amplificação pela técnica de PCR, utilizando-se como molde o plasmídeo pJ204. Baseados na sequência do DNA do vírus SV40 (número de acesso no *GenBank* M99357.1), foram confeccionados dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), contendo um sítio artificial de restrição em cada extremidade (*Bgl*I). Os iniciadores foram desenhados de forma a amplificar um fragmento de 322 pb, uma vez que a DTS, em seu tamanho de 372pb, encontra-se patenteada (Dean, 1998). As sequências dos iniciadores e do sítio de restrição utilizados encontram-se listadas na Tabela 3

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 5 µL do tampão de amplificação Pfx 10X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; estabilizadores e 50% (v/v) glicerol – Invitrogen), 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen), 1 µL do *primer* DTS F e 1 µL do *primer* DTS R, ambos a 100 pmol/µL, 1 µL (20 ng/ µL) do DNA plasmideano pJ204, 0,4 µL da enzima DNA polimerase Pfx Platinum® 2,5 U/µL (Invitrogen) e 39,6 µL de água ultrapura estéril. Para

controle negativo da reação, foi adicionada água ultrapura estéril ao invés de DNA. A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador modelo *ATC 401* (NYX TECHNIK, Inc.), sob as seguintes condições: primeira desnaturação à 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação à 95°C durante 30 segundos; anelamento dos *primers* à 60°C por 30 segundos; extensão à 68°C durante 50 segundos e extensão final à 68°C por 7 minutos.

Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5 µL do produto de amplificação foi depositada e resolvida em gel de agarose à 1%, como descrito no item 4.3.

4.4.3 Digestão enzimática e purificação do fragmento referente à DTS de SV40

Os fragmentos referentes à DTS foram submetidos a uma reação de digestão enzimática para permitir sua posterior ligação ao plasmídeo pValac::*gfp*. A reação foi realizada em um volume de 25 µL, que consistiu em 20 µL (40 ng/µL) de DNA obtido por PCR (item 4.4.2.2), 2,5 µL de tampão D 10X (60 mM Tris-HCL, pH 7.9; 1.5 M NaCl; 60 mM MgCl₂ e 10 mM DTT – Promega), 1,5 µL da enzima *Bgl*I 10U/ µL (Promega) e 1 µL de água ultrapura estéril. A reação foi mantida à 37°C durante 8 horas. Logo após, o volume total da reação de digestão foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% e ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes à DTS foram purificados com o *kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA obtido foram então estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e leitura em espectrofotômetro, observando-se as razões de absorbância 260 nm/280 nm.

4.4.4 Extração do plasmídeo pValac::*gfp*

A extração dos plasmídeos pValac::*gfp* foi realizada a partir de colônias de *E. coli* TG1 pValac::*gfp* inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com 10 µg/mL do antibiótico clorafenicol (Cm).

Os inóculos foram incubados à 37°C sob agitação durante 18 horas e após esse período, procedeu-se extração plasmídeana em pequena escala (*mini prep*), pelo método de lise alcalina, descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), com as modificações que se seguem: 4 mL de cada inóculo foram centrifugados por 7 minutos à 13.000 rpm e os precipitados celulares, ressuspensos em 200 µL de Solução I, acrescidos de 1 µL de RNase A (100 µg/mL). Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, 400 µL de Solução II foram acrescentados à mistura anterior e esta

foi homogeneizada gentilmente por inversão dos tubos. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foram adicionados e, por fim, 300 µL de Solução III. A mistura foi homogeneizada em *vortex* e centrifugada à 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, cerca de 500 µL, foi coletado em novos tubos onde foi feita a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de acetato de sódio (3 M) e 1% de glicogênio (20 mg/mL). Os tubos foram então incubados por aproximadamente 2 horas à -20°C e após esse período, foram centrifugados por 15 minutos à 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Após lavagem com 1 mL de etanol 70%, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 25 µL de água ultrapura estéril. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3.

Soluções

Solução I (Ressuspensão): 0,45 g de glicose anidra; 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8.0; 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0; água destilada q.s.p. 50 mL.

Solução II (Lise): 200 µL de NaOH 5M; 250 µL de SDS 20%; água destilada q.s.p. 5 mL. Esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização.

Solução III (Neutralização): 30 mL de acetato de potássio 5 M; 5,75 mL de ácido acético glacial; água destilada q.s.p. 50 mL.

Glicogênio (20 mg/mL): 100 mg de glicogênio dissolvidos em 5 mL de água destilada.

Acetato de Sódio (3 M): 12,3 g de acetato de sódio; água destilada q.s.p. 50 mL.

Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto; 30 mL de água destilada.

4.4.5 Digestão enzimática e purificação do plasmídeo pValac::*gfp*

Para clonagem da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::*gfp* (Figura 7), os plasmídeos extraídos (item 4.4.4) foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*III. A reação de digestão enzimática foi realizada em um volume de 25 µL, que consistiu em 20 µL de DNA plasmideano obtido por *mini prep* (80 ng/µL), 2,5 µL de tampão REact[®]3 10X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM MgCl₂ e 100 mM NaCl – Invitrogen), 1,0 µL da enzima *Bgl*III 10U/ µL (Invitrogen) e 1,5 µL de água ultrapura estéril. A reação foi mantida à 37°C durante 8 horas.

Logo após, o volume total da reação de digestão foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% e ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao plasmídeo pValac::gfp digerido foram purificados com o *kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA obtido foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e leitura em espectrofotômetro, observando-se as razões de absorbância 260 nm/280 nm.

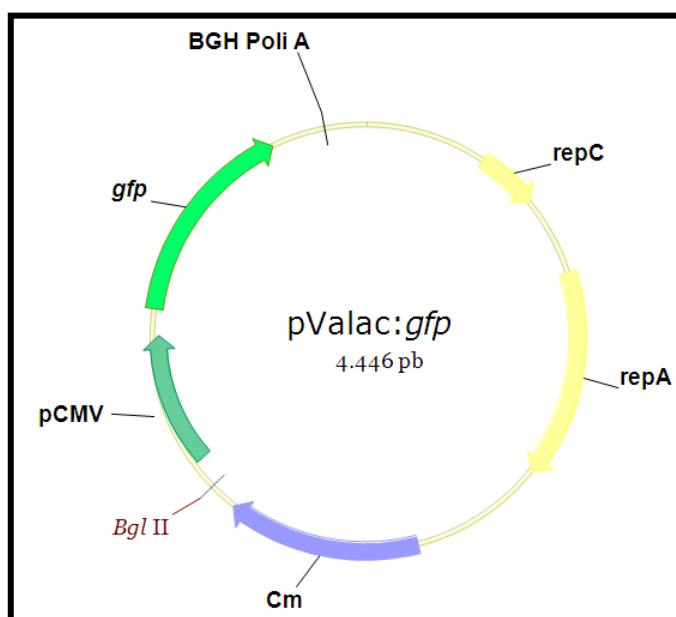


Figura 7: Representação esquemática do plasmídeo de expressão eucariótica pValac::gfp. pCMV: promotor do citomegalovírus; GFP: sequência codificadora da proteína verde fluorescente; BGH poli-A: sequência sinal de poliadenilação do Hormônio de Crescimento Bovino; repC e repA: origens de replicação procariótica; Cm: gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol; BglII: sítio de restrição utilizado

4.4.6 Desfosforilação do plasmídeo pValac::gfp com Fosfatase Alcalina de Camarão

Para evitar a auto-ligação dos plasmídeos pValac::gfp digeridos, foi realizada uma reação de desfosforilação dos mesmos com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*) da Promega. A reação, que consistiu de 7 µL (70 ng/µL) do DNA plasmideano pValac::gfp digerido e purificado (item 4.4.5), 1 µL do tampão de reação 10X (50 mM Tris-Cl pH 9.0 e 10 mM MgCl₂), 1 µL da enzima SAP 1U/ µL e 1 µL de água ultrapura estéril, foi incubada à 37°C durante 1 hora e 30 minutos. Após esse tempo, a enzima fosfatase alcalina foi inativada por incubação da reação à 65 °C, durante 20 minutos.

4.4.7 Ligação da DTS de SV40 ao plasmídeo pValac::*gfp*

Os produtos digeridos e purificados, correspondentes à Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 (item 4.4.3) e ao plasmídeo pValac:*gfp* (item 4.4.6), foram submetidos a uma reação de ligação, que conteve 6 µL da DTS purificada (30 ng/µL), 2 µL do plasmídeo pValac:*gfp* purificado (20 ng/µL), 1 µL de tampão Ligase 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7.8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT e 100 mM ATP – Promega) e 1 µL da enzima T4 DNA Ligase 3U/µL (Promega). A reação foi mantida à 4°C durante 18 horas, período após o qual a mesma foi submetida à diálise, utilizando-se um filtro de 0,025 µm (Millipore) sob água ultrapura, durante 30 minutos.

4.4.8 Transformação de *E. coli* TG1 eletrocompetente com o plasmídeo pValac::*DTS*::*gfp*

O produto de ligação entre a DTS e o vetor pValac::*gfp* foi utilizado para transformar, por eletroporação, células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. Para tanto, 10 µL do produto de ligação dialisado foi misturado a 100 µL de células de *E. coli* TG1 eletrocompetentes, sendo a mistura incubada no gelo por 10 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho *GenePulser Xcell*TM (BIO-RAD), seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 4.4.1. Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram eletroporadas sem adição de DNA.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 100 e 200 µL da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 µg/mL de Cm. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por aproximadamente 18 horas e após este período, foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao antibiótico. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a estocagem dos mesmos, com extração plasmidiana e com a confirmação da clonagem da DTS no plasmídeo pValac::*gfp*.

4.4.9 Confirmação da presença da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::*DTS*::*gfp*

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Cm 10 µg/mL e os inóculos foram mantidos à 37°C sob agitação por cerca de 18 horas. Uma alíquota (1 mL) de cada cultura foi estocada à -80°C, utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante da cultura foi transferido para microtubos e procedeu-se com a extração plasmidiana (*miniprep*) pelo método de lise alcalina, conforme item 4.4.4.

Para verificar a presença do inserto DTS e o peso molecular do mesmo, clonado no vetor pValac::*gfp*, foram realizadas reações de PCR utilizando iniciadores tanto para amplificação da DTS (DTS F e DTS R; Tabela 3) quanto para amplificação de parte do referido plasmídeo (*ORF GFP*; Val F e Val R; Tabela 3), além de digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Bgl*I.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 μ L, contendo 5 μ L de tampão 5X Green Go Taq[®] Flexi (Promega), 2 μ L de MgCl₂ 25mM (Promega), 1 μ L de dNTP 10 mM, 0,5 μ L do *primer forward* e 0,5 μ L do *primer reverse*, ambos a 100 pmol/ μ L (reações com *primers* DTS F e R e Val F e Val R foram conduzidas separadamente), 0,3 μ L da enzima DNA polimerase Go Taq[®] 5U/ μ L (Promega), 15,2 μ L de água ultrapura estéril e 0,5 μ L de DNA (50 ng/ μ L) das *minipreps* supracitadas. A amplificação foi conduzida em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.), sob as seguintes condições: primeira desnaturação à 94°C durante 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação à 94°C durante 30 segundos, anelamento dos *primers* à 60°C por 30 segundos, extensão à 72°C durante 1 minuto e extensão final à 68°C por 7 minutos. Ao final, 2 μ L destas reações foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3

As reações de digestão enzimática foram realizadas em volume de 10 μ L, que consistiu em 6 μ L (50 ng/ μ L) de DNA plasmideano extraído dos clones selecionados, 1 μ L do tampão D 10X (60 mM Tris-HCL, pH 7.9; 1.5 M NaCl; 60 mM MgCl₂ e 10 mM DTT – Promega), 1 μ L da enzima *Bgl*I 10U/ μ L (Promega) e 2 μ L de água ultrapura estéril. As reações foram mantidas a 37° por 8 horas e após esse período, todo seu volume foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1%, conforme condições descritas no 4.3.

4.4.9.1 Reação de sequenciamento e análises in silico

A sequência nucleotídica do inserto DTS presente no plasmídeo pValac::DTS::*gfp* foi confirmada através de sequenciamento, utilizando-se os *primers* DTS F e R (Tabela 3). Para isto, foi escolhido o clone de *E. coli* pValacDTS:*gfp* cuja presença do inserto foi confirmada por reações de PCR e digestão enzimática (item 4.4.9), sendo realizadas três repetições da reação de sequenciamento com o *primer forward* e três repetições com o *primer reverse*. Cada amostra foi amplificada utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE Healthcare), como se segue: 4,0 μ L do *mix "ET dye terminator"*, 1 μ L do *primer* DTS F ou R (10 pmol/ μ L) e 5 μ L de DNA plasmideano (50 ng/ μ L) (*miniprep* item 4.4.9). A reação ocorreu em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial à 95°C por 1 minuto,

seguida por 30 ciclos de de desnaturação à 95°C por 20 segundos, anelamento do *primer* à 60°C por 15 segundos e extensão à 60°C por 1 minuto e 20 segundos.

Logo após, os produtos da reação foram precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídeos marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para tanto, à cada amostra foi adicionado 1 µL acetato de amônio 7,5 M (fornecido pelo *kit*) e 30 µL de etanol 96%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Seguiu-se então com centrifugação à 4.000 rpm, durante 45 minutos, à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 100 µL de etanol 70% às amostras e as mesmas foram centrifugadas à 4.000 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado. Por fim, as amostras, precipitadas e secas, foram ressuspensas em 10 µL de “*loading buffer*” e armazenadas à 4 °C até o momento de sua aplicação no sequenciador MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare).

As sequências obtidas foram comparadas utilizando-se o programa CAP3 *Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde foi obtido um *contig* único do clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi então analisado utilizando-se o programa Vector NTI 8.0 (Informax).

4.5 VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO PLASMÍDEO pValac::DTS::gfp EM CULTURA DE CÉLULAS MAMÍFERAS

4.5.1 Cultura de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*)

Células da linhagem Flp-In™-CHO zeocina resistentes (Invitrogen), armazenadas à -196°C em nitrogênio líquido e contendo meio completo com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), foram rapidamente descongeladas e colocadas em tubo tipo *falcon* com 3 mL do meio de cultura F12 Ham suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, zeocina (100 ng/mL) e 2,5% do agente tamponante HEPES (meio referido a seguir como “F12 completo”). As células foram então centrifugadas a 800 rpm, durante 5 minutos, à 25°C e o sobrenadante foi descartado. Essa etapa de “lavagem” se fez necessária para eliminação do DMSO, que é tóxico às células. Em seguida, foram acrescentados 10 mL de meio F12 completo ao sedimento celular e essa mistura foi transferida para uma garrafa de 75 cm². As células foram incubadas em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂, até formação de uma monocamada, o que geralmente acontecia após 48 horas de crescimento.

Após a formação da monocamada celular, o meio foi descartado e as células foram tripsinizadas. Para tanto, a garrafa foi brevemente lavada com 2 mL de tripsina, sendo este conteúdo subsequentemente descartado e mais 1,5 mL de tripsina adicionado às células. A

garrafa foi deixada em repouso por 3 minutos à 37°C, período após o qual lhe foram aplicadas batidas vigorosas para que as células desaderissem. O excesso de células foi descartado ou utilizado para montagem de nova garrafa ou de placas. No dia posterior à tripsinização, o meio de cultura foi trocado para eliminação de células mortas e/ou não aderidas. Todas as manipulações foram realizadas em capela exclusiva para cultivo celular e as células foram visualizadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot).

Meios e Soluções

Meio F12 Ham (Sigma): o meio F12 foi preparado conforme recomendações do fabricante, esterilizado a vácuo utilizando-se filtro de 0,22 µm, sendo o pH ajustado para 7,0 e o meio armazenado à 4°C. O meio completo, por sua vez, foi preparado adicionando-se ao F12, 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), 100 ng/mL de zeocina e 2,5% de HEPES (Sigma), todos filtrados anteriormente ou estéreis. Após preparo, o meio F12 completo passou por um teste de esterilidade, onde 200 µL do meio foram colocados em meios de cultura para bactérias (BHI e TSB), fungos e leveduras (Sabouraud) e mantidos à 37°C ou temperatura ambiente, respectivamente. Além disto, 3 mL do meio completo também foram colocados em vidro estéril em estufa à 37°C. Durante 14 dias, o crescimento de bactérias e fungos foi acompanhado, sendo que com 5 dias sem contaminação, o meio pôde ser utilizado.

L-glutamina (Sigma): 14,6 g de L-glutamina foram dissolvidos em água ultrapura q.s.p. 500 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

HEPES (Sigma) 1 M: 23,9 g de HEPES foram dissolvidos em 80 mL de água ultrapura, o pH foi ajustado em 7,2 e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

4.5.2 Transfecção de células CHO com os plasmídeos pValac::DTS::gfp e pValac::gfp

4.5.2.1 Obtenção do DNA para transfecção

Os DNAs plasmídeos (pValac::DTS::gfp e pValac::gfp) utilizados para transfecção das células CHO foram obtidos a partir das linhagens *E. coli* pvalac::DTS::gfp e *E. coli* pValac::gfp, respectivamente, utilizando-se o kit Qiagen® Plasmid Midi, conforme

recomendações do fabricante. Após a extração plasmideana, a concentração e pureza do DNA obtido foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e leitura em espectrofotômetro, observando-se as razões de absorbância 260 nm/ 280 nm. No momento da transfecção, os respectivos DNAs foram esterilizados utilizando-se filtros de 0,22 µm.

4.5.2.2 Padronização da transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::gfp, utilizando o reagente Lipofectamine 2000™ (Invitrogen)

As células CHO, crescidas até a formação de monocamada (item 4.5.1), foram tripsinizadas, transferidas para um tubo tipo *falcon* e centrifugadas a 800 rpm, durante 5 minutos, à 25°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 2 mL de meio F12 completo para posterior contagem das células em câmara de Neubauer. Placas de 6 poços foram utilizadas para transfecção, sendo que a cada poço foram adicionadas cerca de 200.000 células, além de 2 mL de meio F12 completo. As placas foram então mantidas em estufa de CO₂, à 37°C, durante 48 horas para obtenção de confluência celular entre 90 a 95%, necessária à transfecção.

Para a padronização da transfecção, transcorrido o tempo necessário para a obtenção da confluência celular, o meio de cultura das placas foi substituído por 1,5 mL de meio F12 completo fresco, adicionados a cada poço. Foram utilizados 4 µg de DNA (pValac::gfp) diluídos em 250 µL de meio *Opti-MEM® I Reduced Serum Media* (Invitrogen) e o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nas proporções “DNA(µg):Lipofectamine(µL)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, também diluídas em 250 µL de *Opti-MEM®*. As diluições “DNA – Opti-MEM” e “Lipofectamine – Opti-MEM” foram incubadas, separadamente, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, estas foram misturadas e mantidas em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente para vesicularização do DNA nos lipossomos. Por fim, a mistura foi adicionada aos poços (cerca de 520 µL por poço), sendo as placas incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, por 24, 48 e 72 horas, a fim de se verificar a expressão da proteína GFP. O controle negativo do experimento consistiu em submeter as células ao tratamento com Lipofectamine e Optimem, mas não à transfecção com DNA. Como o meio de cultura pode ser trocado após 4 horas da transfecção, duas condições foram também testadas: manutenção do meio de cultura inicial ou sua troca por meio F12 completo fresco contendo 1% de uma suspensão de antibiótico e antimicótico estabilizada (Sigma).

Após a transfecção celular com o plasmídeo pValac::gfp, a fluorescência da proteína GFP pôde ser visualizada em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200,

utilizando-se o filtro azul (objetiva de 20X). As imagens foram então capturadas em câmera AxioCam HRc (ZEISS) utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

4.5.2.3 Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::DTS::gfp

A partir da padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac::gfp, todos os experimentos de transfecção que se seguiram foram realizados nas melhores condições obtidas, utilizando-se o plasmídeo pValac::DTS::gfp.

4.5.3 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp, bem como a eficiência do experimento de transfecção em geral, as culturas celulares transfectadas com o referido plasmídeo foram analisadas quanto à expressão de GFP, através de microscopia de fluorescência. Para tanto, 48 horas pós-transfecção, as placas foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200, onde a fluorescência de GFP foi detectada por meio de excitação com luz azul, com comprimento de onda de 488 nm. As imagens foram então capturadas em câmera AxioCam HRc (ZEISS) utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

4.5.4 Ensaio de Citometria de Fluxo para comparação da expressão de GFP por células CHO transfectadas com os plasmídeos pValac::DTS::gfp e pValac::gfp

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de propriedades físicas e biológicas de populações e sub-populações celulares (Bacal e Faulhaber, 2003). Um dos fundamentos desta metodologia é a capacidade de mensurar propriedades de células individuais, através do emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes e recursos de informática (Bertho, 2007). Quando uma amostra em solução é injetada no citômetro de fluxo, as células são ordenadas de tal forma que uma única célula por vez seja interceptada por um laser, sendo que a dispersão de luz (*scatter*) e a emissão de fluorescência por células que foram marcadas com fluorocromos ou que expressam proteínas naturalmente fluorescentes fornecem informações sobre as propriedades destas células (Rahman, 2006). O parâmetro *Forward Scatter* (FSC) se relaciona com o tamanho celular e o *Side Scatter* (SSC), com sua granulosidade. A fluorescência emitida pelas células

é detectada por fotodetectores de fluorescência, sendo que os mais difundidos nos citômetros de fluxo atualmente disponíveis são o FL-1, o FL-2 e o FL-3, os quais são capazes de detectar comprimentos de onda emitidos pelo fluorocromo FITC (verde), PE (laranja) e Cy5 (vermelho), respectivamente. Medições da fluorescência emitida pelas células analisadas podem fornecer dados quantitativos e qualitativos sobre a presença de receptores de membrana e mesmo de componentes intracitoplasmáticos ou nucleares (Rahman, 2006). Assim sendo, esta técnica apresenta uma ampla gama de aplicações nas áreas médica e biotecnológica, incluindo estudos de subpopulações linfocíticas, análises de expressão gênica, diagnósticos de doenças, análises de ciclo celular e pesquisas que envolvam vacinas de DNA (Bertho, 2007; Badger *et al.*, 2011).

Neste trabalho, visando analisar a influência da presença DTS de SV40 na estrutura do plasmídeo pValac:*gfp*, no que concerne ao aumento dos níveis de expressão gênica, foi realizada, por meio de citometria de fluxo, uma análise comparativo-quantitativa entre a expressão de GFP por células transfectadas com os plasmídeos pValac::DTS::*gfp* e pValac::*gfp* (controle).

Para tanto, células CHO foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo adicionadas a cada poço, aproximadamente 200.000 células. As placas foram incubadas em estufa de CO₂, à 37°C, durante 48 horas. Transcorrido esse tempo, e atingida a confluência celular necessária, uma parte das células CHO foi submetida à transfecção (conforme item 4.5.2.2) com o plasmídeo pValac::*gfp* (3 poços) e a outra parte, com o plasmídeo pValac::DTS::*gfp* (3 poços). Em outros 3 poços, as células foram mantidas sem transfecção, para controle negativo do experimento. Decorridas 48 horas pós-transfecção, o meio de cultura das placas foi retirado, as células foram tripsinizadas e recolhidas em tubos tipo *falcon*, onde se completou o volume para 10 mL com meio F12 completo, para neutralização da trispina. Por fim, as células foram centrifugadas à 1.200 rpm, 25°C, durante 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato salina 1X (PBS) e contadas em câmara de Neubauer.

Este material foi então transferido para tubos apropriados à aquisição das amostras e esta foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD) utilizando o *software* específico CellQuest (BD). Cerca de 50.000 células (eventos) foram adquiridas por amostra. Os eventos adquiridos eram automaticamente plotados em um gráfico de dispersão de pontos, conhecido como *dot plot*, com base em seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC), além de ser gerado também um histograma que refletia os parâmetros SSC/FL-1, ou seja, o nível de fluorescência exibido pelos eventos. Posteriormente, com o auxílio do programa *FlowJo* 7.6.4 (TreeStar Inc.), foi delimitada uma região, dentro dos eventos totais, que abrangesse apenas a população mais homogênea, excluindo aqueles com padrões diversificados, onde possivelmente encontravam-se células mortas, restos celulares ou a detecção de mais de

uma célula por vez. Esta região foi selecionada (“gated”) e utilizada para a obtenção de uma análise mais acurada da expressão gênica (Fig. 8). Dessa forma, foram gerados dados referentes à porcentagem de células positivas para expressão de GFP bem como a intensidade de fluorescência exibida pelas células, dado este fornecido como um valor de mediana. Três experimentos independentes foram realizados para aquisição de dados.

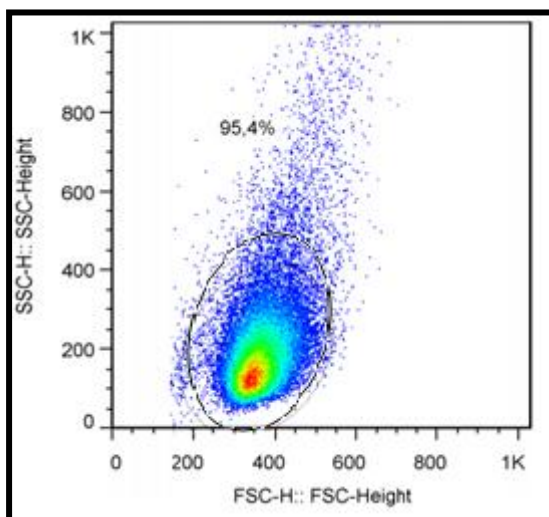


Figura 8: Perfil puntual representativo de células CHO. Perfil de localização das células CHO no *dot plot*, de acordo com seu tamanho (FSC; eixo X) e granulosidade (SSC; eixo Y). A população selecionada representa as células consideradas para análise da expressão de GFP.

4.5.4.1 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados pelo teste t não pareado e pelo teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas no software *GraphPad Prism 5.0*. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

4.5.5 Ensaios de transcrição reversa e RT-PCR

Visando confrontar os resultados obtidos por citometria de fluxo, com experimentos futuros de análise de expressão diferencial através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), buscou-se primeiramente neste trabalho padronizar os experimentos de extração do RNA total, especialmente no que tange à eliminação de DNAs contaminantes das amostras. Essa padronização se fez necessária uma vez que a obtenção de amostras de RNA isentas de contaminação por DNA, sobretudo por DNA plasmideano, é um processo relativamente complexo. Foram realizados também ensaios de transcrição reversa e reações subsequentes de RT PCR (do inglês, *Reverse Transcription* -PCR).

4.5.5.1 Extração do RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::DTS::gfp, conforme item 4.5.2.2, utilizando-se o *kit RNeasy® Mini* (Qiagen). Para tanto, 48 horas após a transfecção, células provenientes de 3 poços (de uma placa de 6 poços) foram tripsinizadas e recolhidas em tubos tipo *falcon*, onde se completou o volume para 10 mL com meio F12 completo, para neutralização da tripsina. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm, 25 °C, durante 8 minutos, e o sobrenadante foi descartado, sendo as células ressuspensas em 1 mL de PBS livre de RNase. Por fim, as células foram novamente centrifugadas para formação do sedimento celular e este foi então submetido à extração de RNA, conforme recomendações do fabricante do *kit*. As amostras foram submetidas à digestão por DNase livre de RNase (Qiagen) durante e ao final do protocolo de extração. O RNA extraído foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro e também resolvido em gel de agarose à 1% para verificação de sua integridade, através da visualização dos RNAs ribossômicos (rRNA) 28S e 18S. Todos os procedimentos que envolveram a manipulação do RNA foram realizados utilizando-se materiais dedicados exclusivamente a esta finalidade, como água, ponteiras plásticas contendo filtro e microtubos, todos “RNase-free”. A superfície das bancadas, dos equipamentos e das micropipetas utilizadas foram higienizadas e tratadas com o reagente “RNase AWAY®” (Sigma), conforme recomendação do fabricante.

4.5.5.2 Síntese do cDNA e RT-PCR

A reação de síntese da fita de DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa foi realizada com o *kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas), utilizando-se o RNA extraído em 4.5.5.1. A reação constitui de 1 µg do RNA total extraído (ou 100 fg de RNA específico do gene GAPDH - Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase - para controle positivo), 1 µL de primer Oligo(dT)₁₈ e água livre de nucleases q.s.p 12 µL, sendo estas reações mantidas à 65°C, em termociclador, durante 5 minutos. Transcorrido esse tempo, a cada reação foram adicionados 4 µL de “*Reaction Buffer*” 5X, 1 µL do inibidor de RNases “*RiboLock™ RNase Inhibitor* (20 u/µL)”, 2 µL de “dNTP Mix” (10 mM) e 1 µL da enzima transcriptase reversa “*RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase*” (200 U/µL), sendo estas reações finais incubadas durante 60 minutos à 42°C, em termociclador. Para inativação da transcriptase reversa, ao final desse processo as reações foram mantidas à 70°C durante 5 minutos.

As amostras contendo os cDNAs gerados foram então utilizadas em reações de RT-PCR, em volume final de 25 µL, contendo 5 µL de tampão “5X Green Go Taq® Flexi” (Promega), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL dos *primers* GFP int F e GFP int R (Tabela 3), os quais amplificam um fragmento interno de 127pb da ORF GFP, 0,3 µL da enzima DNA polimerase Go Taq® 5U/ µL (Promega), 14,7 µL de água ultrapura estéril e 1 µL de cDNA. Para a amostra de cDNA do controle positivo, 1,5 µL dos *primers forward* e *reverse* específicos para GAPDH (10 µM/µL; Tabela 3) e 2 µL do seu cDNA diluído 1:1.000 foram utilizados. Como controle negativo, além de reação em cuja preparação foi adicionada apenas água ultrapura estéril ao invés de cDNA, foram feitas também reações adicionando o RNA extraído ao invés de cDNA, no intuito de rastrear possíveis contaminações das amostras por DNA genômico e plasmideano.

A RT-PCR foi realizada em termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação à 94°C, durante 30 segundos; anelamento dos primers à 60 °C durante 30 segundos; extensão à 72°C durante 50 segundos e extensão final à 72°C durante 5 minutos. Logo após, o produto amplificado foi depositado, resolvido e analisado em gel de agarose à 1%.

4.6 OBTENÇÃO DE *Lactococcus lactis* FNBPA⁺ CARREANDO O VETOR pValac::DTS::gfp

4.6.1 Confeção de células eletrocompetentes de *L. lactis* FNBPA⁺

A preparação de células eletrocompetentes de *L. lactis* FNBPA⁺ foi realizada como se segue. Foi realizado um primeiro inóculo com 10 µL do estoque de *L. lactis* FNBPA⁺ em 5 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido ainda de 5 µg/mL do antibiótico eritromicina (Ery). Este inóculo foi mantido à 30°C, sem agitação, por 20 horas. Transcorrido esse período, um segundo inóculo foi realizado, utilizando-se 100 µL dessa primeira cultura, que foi novamente inoculada em 5 mL do meio M17-Sac-Gli Ery e incubada à 30°C, sem agitação, por 8 horas. Em seguida, uma alíquota de 1 µL desta última cultura foi então inoculada em 200 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 1% de glicina. Uma vez alcançada a DO_{600nm} em torno de 0,4 - 0,6, a cultura foi centrifugada à 4.000 rpm durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em 200 mL de uma solução gelada e estéril constituída de sacarose 0,5 M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais quatro vezes e após a última lavagem, o precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de uma solução estéril constituída de polietileno

glicol 3000 à 30% (PEG3000) e glicerol à 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas à -80°C até o momento de sua utilização.

Soluções

Glicina: a solução estoque 20% de glicina foi preparada diluindo-se 10g desta em água destilada q.s.p. 50 mL e esterelizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

Sacarose 0.5 M e glicerol 10%: 171,1g de sacarose, 100mL de glicerina e água destilada q.s.p. 1L, sendo a solução esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

PEG3000 30% e glicerol 10%: 3g de PEG3000, 1mL de glicerol e água destilada q.s.p. 10 mL.

4.6.2 Transformação de *L. lactis* FnBPA⁺ com o plasmídeo pValac::DTS::gfp

Os plasmídeos pValac::DTS::gfp extraídos do clone de *E. coli*, confirmado por sequenciamento, foram utilizados para transformação de *L. lactis* FnBPA⁺. Uma alíquota de células eletrocompetentes, preparadas conforme item 4.6.1, foi descongelada e 5 µL do DNA plasmideano foram adicionados às mesmas. As células foram mantidas em contato com o DNA por 5 minutos em gelo e em seguida foram transferidas para uma cubeta de 0,2 cm, para eletroporação no aparelho *GenePulser Xcell*TM (BIO-RAD), sob as seguintes condições: 2400 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1mL de meio M17-Sac-Gli foi adicionado às células e a mistura foi então mantida à 30°C, sem agitação, por 3 horas. Por fim, foram semeadas alíquotas de 100 e 200 µL em placas M17-Sac-Gli ágar acrescidas de Cm (5 µg/mL) e Ery (2,5 µg/mL) e estas foram incubadas em estufa à 30°C, por aproximadamente 24 horas, para seleção dos transformantes. Para controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram eletroporadas sem adição de DNA.

Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes tanto ao Cm quanto à Ery. Na etapa seguinte, cinco clones foram selecionados para extração plasmideana e confirmação da presença do plasmídeo pValac::DTS::gfp. Os clones selecionados foram cultivados em meio apropriado, as culturas foram diluídas (1:4) em glicerol 80% e estes foram acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

4.6.3 Extração do DNA plasmidiano de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::DTS::gfp)

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* FnBPA⁺ com o plasmídeo pValac::DTS::gfp foram inoculadas em 5 mL de M17-Sac-Gli suplementado com Ery (2,5 µg/mL) e Cm (5 µg/mL) e a cultura foi mantida à 30°C, sem agitação, por aproximadamente 18 horas. Para extração plasmideana, foi utilizado o método de lise alcalina assim como descrito no item 4.4.4, com a seguinte modificação: após a primeira centrifugação, foram adicionados ao precipitado celular 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS) e a mistura foi incubada à 37°C por meia hora. Após este período, seguiu-se normalmente o protocolo (item 4.4.4).

Soluções

TE-LYS: 500 µL de TE 10X, 100mg de lisozima e água destilada q.s.p 10 mL.

4.6.4 Confirmação dos clones de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::DTS::gfp)

No intuito de se confirmar a obtenção de clones da linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadores do plasmídeo pValac::DTS::gfp, os plasmídeos extraídos (item 4.6.3) foram submetidos a reações de PCR. Estas foram preparadas com 5 µL de tampão 5X Green Go Taq[®] Flexi (Promega), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL do primers DTS F e DTS R, ambos a 100 pmol/µL, 0,3 µL da enzima DNA polimerase Go Taq[®] 5U/µL (Promega), 14,7 µL de água ultrapura estéril e 1,0 µL (100 ng/µL) do DNA plasmideano. Além da confirmação da presença do plasmídeo pValac::DTS::gfp nos clones por meio da utilização de primers específicos para a DTS, foi realizada também uma reação utilizando-se primers específicos para a fibronectina (FnBPA F e FnBPA R; Tabela 3), de modo a também garantir a presença do plasmídeo pOri23-fnbA nos mesmos (o que caracteriza a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺). Ao controle negativo, nenhum DNA foi acrescentado. As reações ocorreram em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as seguintes condições: primeira desnaturação à 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação à 94°C durante 30 segundos; anelamento dos primers gradiente 50-60°C por 30 segundos (primers fibronectina e DTS, respectivamente); extensão à 72°C durante 1 minuto e extensão final por 5 minutos à 72°C.

Vale ressaltar que, com a finalidade de utilização como um controle positivo em experimentos futuros, a linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac::gfp já foi construída (Pereira, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DE ENDEREÇAMENTO NUCLEAR (DTS) DE SV40 NO PLASMÍDEO pValac::*gfp*

5.1.1 Amplificação e purificação da DTS de SV40

O primeiro passo deste trabalho consistiu na amplificação, por PCR, da Sequência de Endereçamento Nuclear do vírus SV40, a partir do plasmídeo pJ204. Para a reação de amplificação, foi utilizada a enzima DNA polimerase Pfx Platinum[®] (Invitrogen), cuja atividade é altamente estável e de alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas de mutações (inserções, deleções, ou trocas) durante a incorporação de nucleotídeos.

Neste contexto, foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 322 pb, assim como esperado para a DTS. Este, quando visualizado em gel de agarose à 1%, apresentou forte intensidade, demonstrando uma alta eficiência da reação, porém também foi observada a presença de um produto de amplificação inespecífico, de maior peso molecular que a DTS. Desta forma, seguiu-se a purificação do fragmento de interesse, de 322 pb, com subsequente digestão deste produto e nova purificação. A digestão do produto de PCR foi empregada para que a DTS pudesse ser clonada no plasmídeo pValac::*gfp*, sendo a digestão possível graças à inserção de sítios artificiais de restrição para a enzima *Bgl*I nos iniciadores utilizados (Tabela 3). Como esperado, não foi observado qualquer produto de amplificação no controle negativo (Fig. 9).

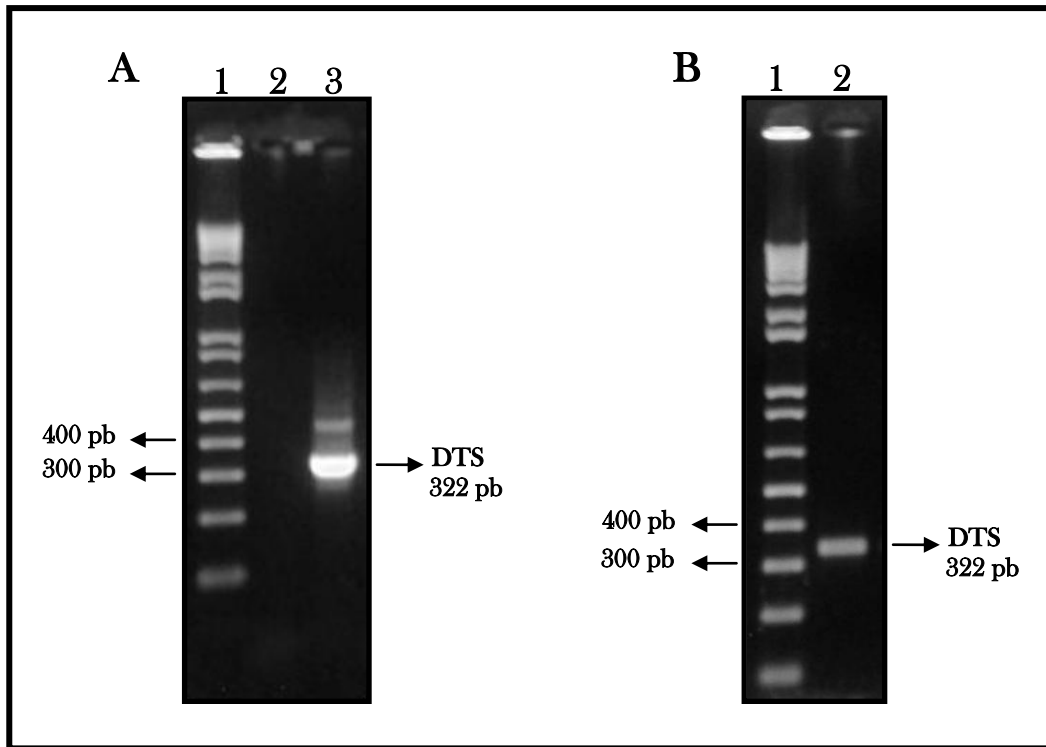


Figura 9: Análise do produto de amplificação por PCR, e purificação da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS) de SV40. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A) Análise do produto de amplificação.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Produto da amplificação da DTS. **B) Purificação do produto de PCR.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Fragmento referente à DTS, digerido e purificado.

5.1.2 Extração, digestão e purificação do plasmídeo pValac::*gfp*

O plasmídeo de expressão eucariótica pValac::*gfp* foi extraído de *E. coli* e submetido a uma reação de digestão enzimática com a endonuclease *Bgl*II. A digestão foi empregada para linearizar o plasmídeo a fim de permitir posterior ligação da Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 em sua estrutura. Por fim, para evitar que os plasmídeos digeridos se religassem, reproduzindo o plasmídeo pValac::*gfp* intacto, os mesmos foram submetidos à desfosforilação com a utilização da enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP – Promega) (Fig. 10).

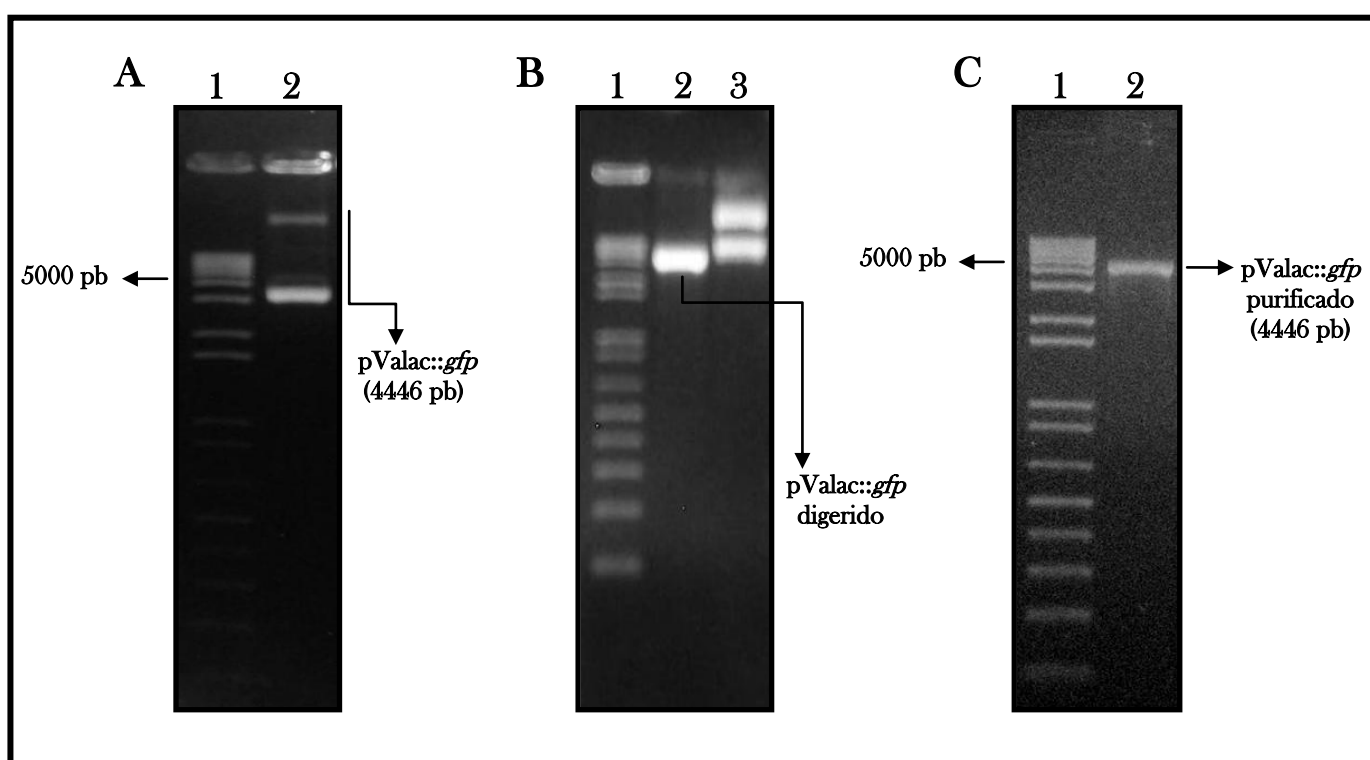


Figura 10: Análise do produto da extração plasmideana, digestão enzimática e purificação do vetor pValac::*gfp*. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A) Análise do produto de extração plasmideana.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto de extração plasmideana; pValac::*gfp* (4.446 pb). **B) Análise do produto de digestão enzimática.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da reação de digestão enzimática do plasmídeo pValac::*gfp* com *Bgl*II; Canaleta 3: pValac::*gfp*, produto de extração plasmideana, utilizado como controle. **C) Análise do produto de purificação.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da purificação do plasmídeo pValac::*gfp* digerido.

5.1.3 Clonagem da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::gfp

Os produtos digeridos e purificados, correspondentes à DTS de SV40 e ao vetor pValac::gfp (itens 5.1.1 e 5.1.2), foram submetidos a uma reação de ligação e esta foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas foi realizada em meio LB ágar contendo 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Cm), tendo sido observadas 19 colônias resistentes ao referido antibiótico. Todas as colônias foram então inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas à 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, 13 clones demonstraram crescimento. Estes por sua vez, foram estocados em glicerol para posterior extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de eletroporação.

Posteriormente, os DNAs plasmídicos extraídos foram utilizados como molde em reações de PCR, utilizando tanto iniciadores específicos para a DTS quanto iniciadores específicos para amplificação da ORF GFP, a fim de se confirmar a presença do inserto e certificar-se de que realmente se tratava do plasmídeo em questão. Dos 13 DNAs plasmídicos extraídos, 12 foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à DTS. Os plasmídeos pJ204 e pValac::gfp foram utilizados como controles positivos das reações e os controles negativos, aos quais foi adicionada apenas água ultrapura estéril no lugar de plasmídeo, não demonstraram quaisquer sinais de amplificação (Fig.11).

Concomitantemente à estratégia de realização de PCR para confirmação dos clones, a estratégia de digestão enzimática foi também empregada. O DNA plasmídico extraído dos 12 possíveis clones foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição *Bgl*II, sendo que apenas dois clones apresentaram o padrão de bandas esperado, ou seja, 322 pb, referentes à DTS e 4.446 pb, correspondentes ao vetor pValac::gfp, linearizado (Fig. 11).

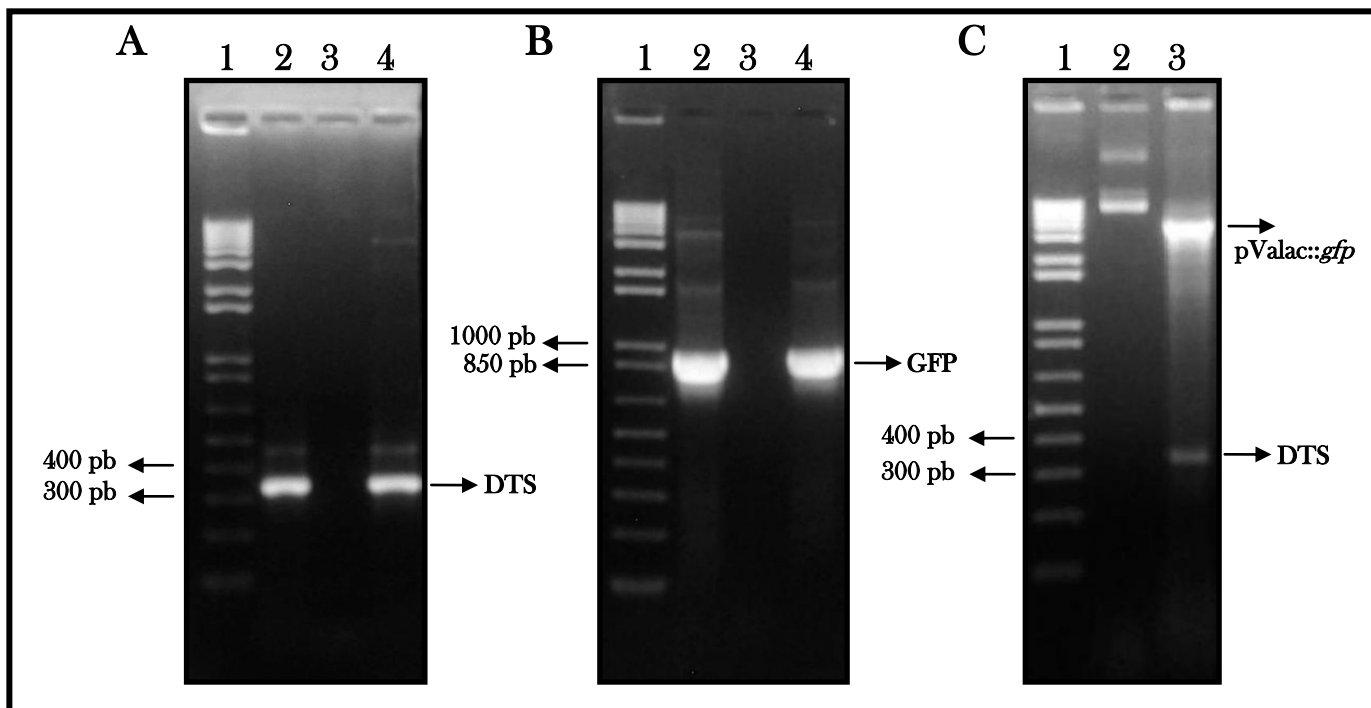


Figura 11: Confirmação da presença da Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 no vetor pValac::DTS::gfp, através de PCR e digestão enzimática. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A) Confirmação da presença da DTS de SV40 no vetor pValac::DTS::gfp, através de PCR, utilizando primers específicos para a DTS.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle positivo (pJ204); Canaleta 3: Controle negativo; Canaleta 4: Amplificação da DTS em um dos clones (322 pb). **B) Confirmação da presença DTS de SV40 no vetor pValac::DTS::gfp, através de PCR, utilizando primers específicos para a ORF GFP.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle positivo (pValac::gfp); Canaleta 3: Controle negativo; Canaleta 4: Amplificação da ORF GFP no mesmo clone (900 pb). **C) Confirmação da presença da DTS de SV40 no vetor pValac::DTS::gfp, através de digestão enzimática.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle, plasmídeo pValac::DTS::gfp extraído do clone confirmado em “A” e “B”; Canaleta 3: Digestão enzimática deste, evidenciando a DTS de SV40.

5.1.4 Reação de sequenciamento e análises *in silico*

O plasmídeo pValac::DTS::gfp foi extraído dos clones de *E. coli* previamente confirmados por PCR e digestão enzimática e um destes clones foi submetido à reação de sequenciamento do inserto, utilizando-se *primers* específicos para a DTS. Posteriormente, um *contig* único da seqüência do clone foi obtido com a utilização do programa *CAP3 Sequence Assembly* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. A partir desta seqüência otimizada, foi possível confirmar a presença do inserto correspondente à Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 no plasmídeo pValac::DTS::gfp, através de alinhamento, utilizando-se o programa *Vector NTI 8.0* (Informax). Além disso, por meio do sequenciamento, também foi possível a visualização de

parte da região promotora e do marcador de seleção ao antibiótico cloranfenicol, presentes no plasmídeo pValac, além da integridade da sequência dos sítios de restrição *Bgl*II no inserto clonado (Figura 12).

```
ACATCATTCTGTTTGTGATGGTTATCATGCAGGATTGTTTATGAACTCTATTCAGGAATTGTCAGATAGGC
CTAATGACTGGCTTTTATAATATGAGATAATGCCGACTGTACTTTTTACAGTCGGTTTTCTAATGTCACTA
ACCTGCCCGTTAGTTGAAGAAGTTTTATATTACAGCTCCAGATCTGGTACCTTCTGAGGCGGAAAG
AACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTAT
GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGA
AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGC
CCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG
CCGAGGCCGCCTCGGCCTGAGCTATTCCAGATCTGCGTTAACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
ATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGT
```

Figura 12: Sequência nucleotídica obtida através de sequenciamento do inserto contido no vetor pValac::DTS::gfp. Sequência em verde: sequência nucleotídica correspondente a parte da região promotora do vetor pValac::gfp; Sequência em vermelho: DTS de SV40; Sequência em azul: sequência nucleotídica correspondente a parte do marcador de seleção. Sequências destacadas em cinza: Sítio de restrição *Bgl*II.

Assim, com a obtenção e confirmação da construção pValac::DTS::gfp, partiu-se então para a avaliação de sua funcionalidade.

5.2 VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO PLASMÍDEO pValac::DTS::gfp EM CULTURA DE CÉLULAS MAMÍFERAS

Uma vez obtida e confirmada a construção pValac::DTS::gfp, o segundo passo deste trabalho consistiu-se da verificação da funcionalidade do referido plasmídeo. Para isto, foram realizados experimentos de transfecção em células mamíferas, seguidos de detecção da expressão da proteína GFP por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e RT-PCR.

5.2.1 Padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac::*gfp*

Foram testadas algumas condições para a padronização da transfecção celular, empregando-se o plasmídeo pValac::*gfp*. O reagente lipossômico Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) foi testado nas proporções “DNA(μ g):Lipofectamine(μ L)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, sendo verificado, por microscopia de fluorescência, que a melhor condição obtida foi a proporção 1:3 de DNA (4 μ g):Lipofectamine(12 μ L). Além disso, a avaliação das células transfectadas foi feita nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-transfecção, tendo os melhores níveis de expressão de GFP sido observados no intervalo entre 48 e 72 horas. (Figura 13 D e E). A outra condição testada foi trocar ou não o meio de cultura, decorridas 4 horas da transfecção. O resultado deste último teste não mostrou diferenças com relação à expressão de GFP pelas células, onde então se decidiu pela não-substituição do meio de cultura.

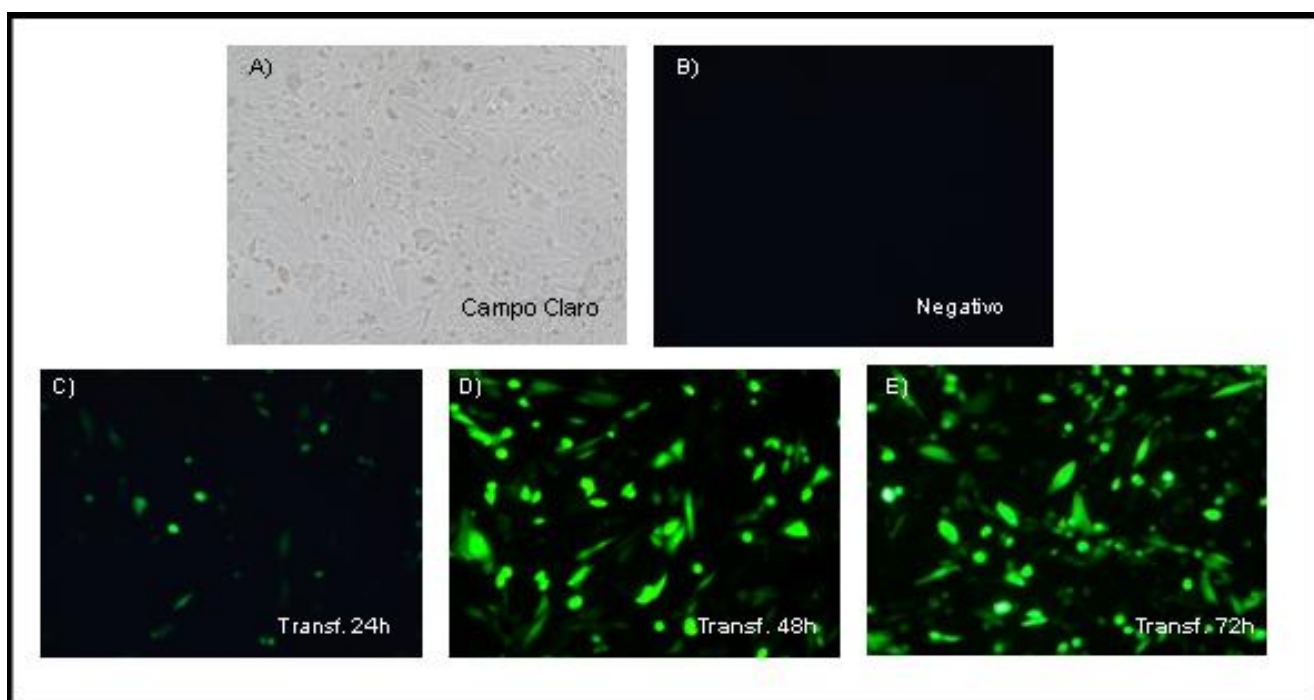


Figura 13: Resultado da padronização da transfecção das células Flp-In™-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac::*gfp* **A)** Campo claro de células da linhagem CHO. **B)** Células CHO não transfectadas. **C)** Células CHO transfectadas com pValac::*gfp* na proporção de DNA (μ g):Lipofectamine (μ L) de 1:3, após 24 horas da transfecção. **D)** Células transfectadas com pValac::*gfp* na proporção de DNA (μ g):Lipofectamine (μ L) de 1:3, após 48 horas da transfecção. **E)** Células transfectadas com pValac::*gfp* na proporção de DNA (μ g):Lipofectamine (μ L) de 1:3, após 72 horas da transfecção. Imagens visualizadas por microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200 (filtro azul; objetiva 20X) e capturadas por câmera AxioCam HRc (ZEISS), utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

5.2.2 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência

Uma vez alcançada a padronização dos experimentos de transfecção, seguiu-se com experimentos para avaliação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp, construído neste trabalho. Através de visualização por meio de microscopia de fluorescência após 48 horas de transfecção, foi possível verificar a expressão da proteína GFP por células CHO, evidenciando assim a funcionalidade deste em células eucarióticas. Além disso, foi verificada uma eficiência satisfatória dos experimentos de transfecção em geral, indicada pela expressão substancial de GFP, tanto por células transfectadas com o plasmídeo pValac::gfp (controle positivo; Fig. 14 A), quanto por células transfectadas com o plasmídeo pValac::DTS::gfp (Fig. 14 B). Células CHO não transfectadas, utilizadas como controle negativo dos experimentos, não exibiram nenhuma fluorescência, assim como esperado (Fig.14 C).

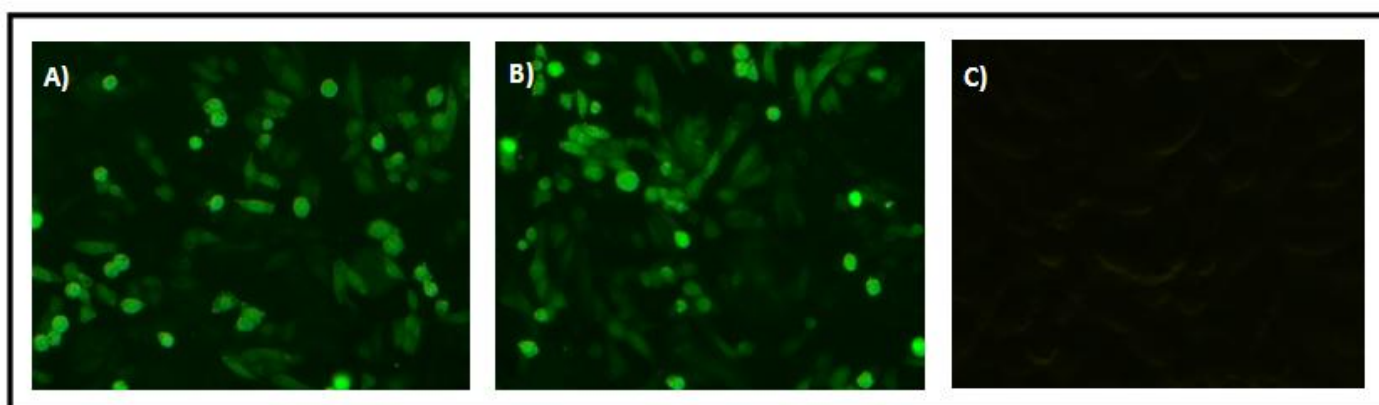


Figura 14: Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::DTS::gfp através de Microscopia de Fluorescência. Micrografia epifluorescente da expressão de GFP por células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) 48 horas pós-transfecção. **A)** Células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::gfp (controle positivo); **B)** Células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::DTS::gfp; **C)** Células não transfectadas (controle negativo). Imagens visualizadas por microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200 (filtro azul; objetiva 20X) e capturadas por câmera AxioCam HRc (ZEISS), utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

5.2.3 Análises Citométricas

Mais do que confirmar a funcionalidade da construção pValac::DTS::gfp, buscou-se averiguar se a presença da DTS na estrutura do vetor pValac::gfp melhoraria o endereçamento do DNA plasmideano ao núcleo das células submetidas ao processo de transfecção. Esta avaliação se deu por meio de análises no nível de expressão gênica, através da técnica de citometria de fluxo, tendo em vista que um maior número de células transfectadas bem como uma maior expressão de GFP pelas mesmas (indicada pela intensidade de fluorescência exibida) pode demonstrar que mais plasmídeos atingiram o núcleo das células, haja vista que a expressão gênica é, em primeira instância, dependente da eficácia da entrega nuclear dos plasmídeos.

A expressão da proteína GFP foi comparada entre células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::gfp (controle positivo; população denominada “GFP”) e células transfectadas com o plasmídeo construído neste trabalho, pValac::DTS::gfp (população denominada “DTS”). Como controle negativo, utilizou-se células CHO não transfectadas (população denominada “NT”). O procedimento de transfecção foi realizado com o reagente comercial Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) e, decorridas 48 horas deste processo, as análises citométricas foram conduzidas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD), sendo os resultados obtidos, analisados através do programa *FlowJo 7.6.4* (TreeStar Inc.). Os dados reportados a seguir são representativos de três experimentos.

As Figuras 15 A, B e C ilustram a porcentagem dos eventos adquiridos que foram selecionados para análise, com base nos parâmetros tamanho e granulosidade das células (FSC e SSC, respectivamente), bem como a porcentagem das células positivas para a expressão de GFP dentro dessas populações selecionadas (SSC / FL1 - espectro de emissão do GFP). O limite entre não expressão de GFP e expressão detectável desta proteína foi estabelecido considerando a população que não foi submetida à transfecção (NT) como ponto de corte. Uma quantidade muito pequena de células desta população apresentou alguma fluorescência, devendo esta observação ser, provavelmente, resultado de autofluorescência das mesmas. Os resultados obtidos apresentam-se também combinados na Figura 15 D, expressos em um histograma [cont. (quantidade de eventos)/FL1 – espectro de emissão do GFP)].

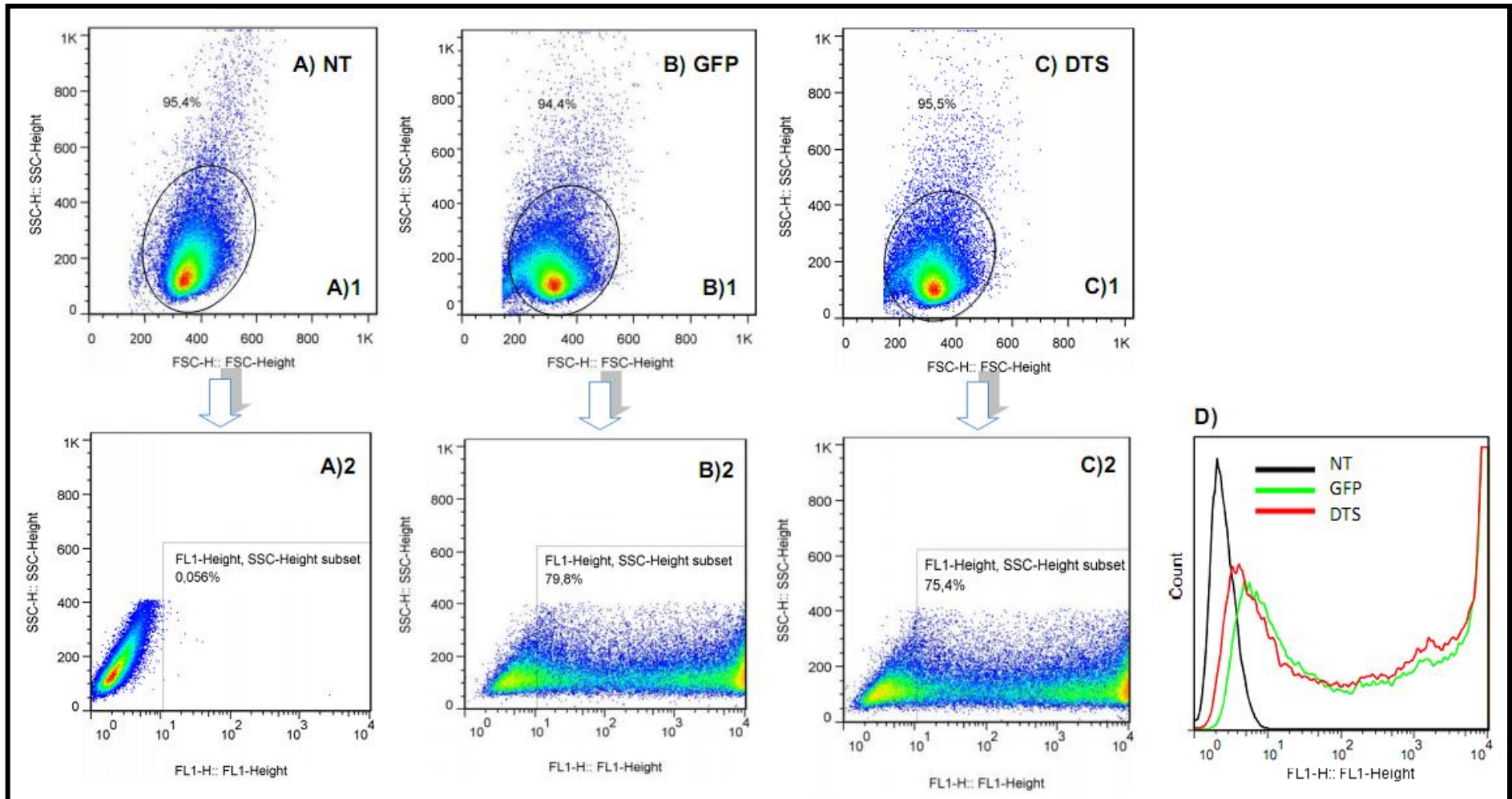


Figura 15: Eventos adquiridos por Citometria de Fluxo, plotados em função de seu tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e emissão de fluorescência (FL-1). Células não transfectadas (A1), transfectadas com o plasmídeo pValac::gfp (B1) e com o plasmídeo pValac::DTS::gfp (C1), adquiridas e consideradas para análise (elipse); A)2, B)2 e C)2: Porcentagem de células positivas para expressão de GFP dentro da população considerada para análise em A)1, B)1 e C)1, respectivamente; D) Histograma de número de células (Count) vs. intensidade de fluorescência exibida (FL-1), representativo de A)2,B)2eC)2.

A despeito de vários trabalhos existentes na literatura terem reportado aumento nos níveis de importação nuclear e de expressão gênica a partir de plasmídeos nos quais a DTS de SV40 foi inserida (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999; Vacik *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2001; Young, Benoit e Dean, 2003; Young, Zimmer e Dean, 2008), neste trabalho não foram observadas diferenças significativas nos níveis tanto de eficiência de transfecção (Fig. 16 A) quanto de expressão gênica (Fig. 16 B), dados por construções plasmideanas em que a DTS estava presente (pValac::DTS::gfp) ou não (pValac::gfp).

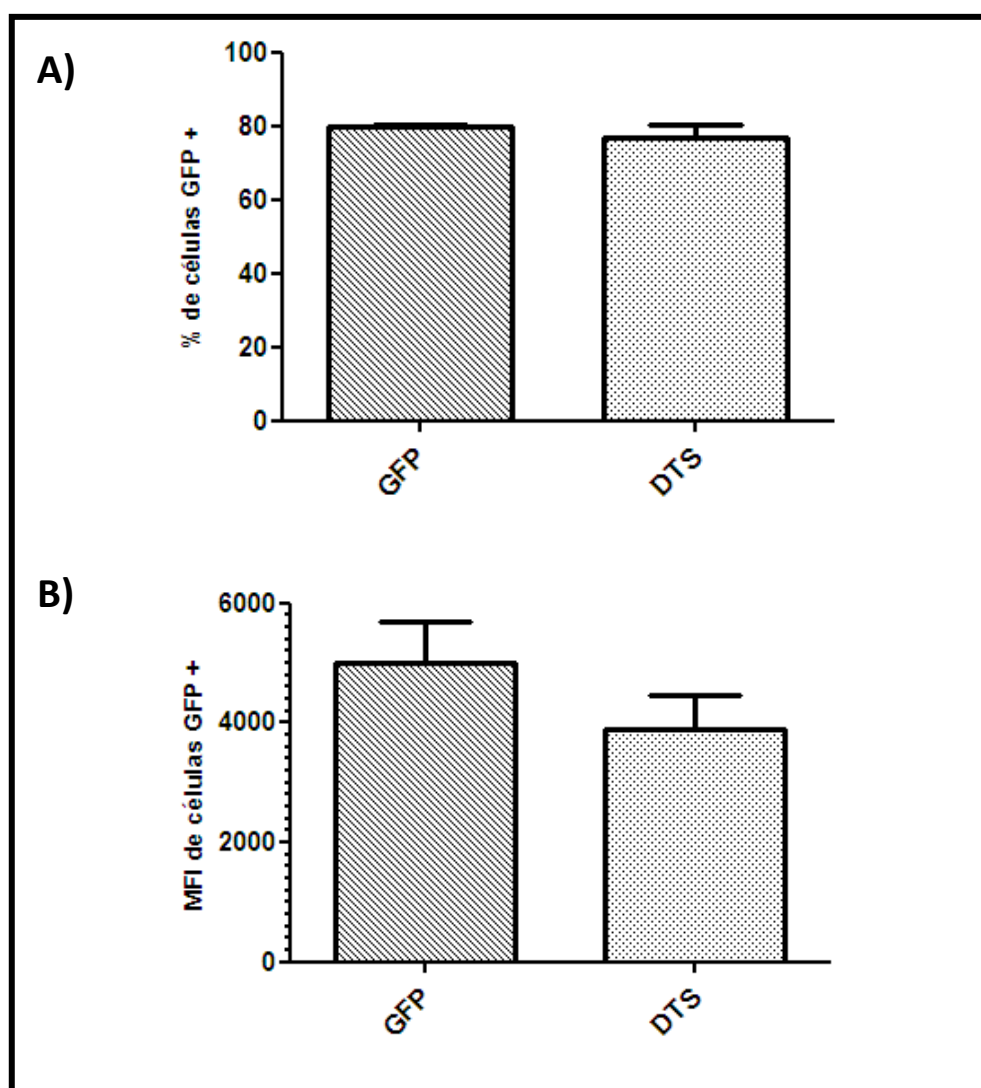


Figura 16: Análise do efeito da DTS sobre a eficiência de transfecção e expressão gênica. A) Porcentagem de células expressando GFP em transfecções realizadas com o plasmídeo pValac::gfp (GFP) e pValac::DTS::gfp (DTS). **B)** Quantificação da expressão de GFP por células transfectadas com o plasmídeo pValac::gfp (GFP) e pValac::DTS::gfp (DTS), dada como mediana da intensidade de fluorescência (MFI) exibida por estas células. Não foram observadas diferenças significativas entre a eficiência de transfecção e expressão gênica, dada por plasmídeos que possuem a DTS de SV40 (pValac::DTS::gfp) e por aqueles que não a contêm (pValac::gfp).

A maioria dos trabalhos que verificaram os efeitos promissores da presença da DTS em plasmídeos, no que se refere ao aumento de sua importação nuclear com consequente aumento da expressão gênica da ORF de interesse, utilizou as técnicas de eletroporação ou microinjeção para entrega destes vetores, métodos conhecidos por entregar DNA nu ao citoplasma. No presente trabalho, o lipídeo catiônico Lipofectamine2000TM (Invitrogen) foi empregado no processo de transfecção.

Considerando que o mecanismo descrito por Dean para captação nuclear dos plasmídeos contendo a DTS consista da ligação de fatores de transcrição a sítios presentes nesta sequência e sua posterior translocação para o núcleo, auxiliada por importinas, a presença do DNA complexado ao Lipofectamine no interior das células poderia interferir na ligação dos referidos fatores e, por conseguinte, na eficiência de entrega nuclear destes plasmídeos. De fato, como observado por Zabner e colaboradores, a dissociação do DNA do complexo lipídico pode ser uma importante variável que limite a transferência e expressão gênicas (Zabner *et al.*, 1995). Todavia, van Gaal e colaboradores reportaram que independentemente da estratégia de entrega adotada – eletroporação, Lipofectamine ou polímero catiônico pEI – eles também não observaram diferenças significativas entre a quantidade de células transfectadas nem entre a média de expressão de GFP por estas células a partir de plasmídeos que contivessem ou não a sequência de endereçamento nuclear de SV40 (van Gaal *et al.*, 2011).

Como mencionado acima, o mecanismo subjacente à importação nuclear mediada pela DTS de SV40 se relaciona com a capacidade de um conjunto de fatores de transcrição se ligarem a sítios presentes nesta sequência. Contudo, uma comparação com outros promotores virais e sequências *enhancer* (como por exemplo, o promotor do citomegalovírus, o qual contém sítios de ligação para NFκB) revelou que a simples presença destes sítios não foi capaz de conduzir a importação nuclear dos plasmídeos testados (Dean, 1997).

Em outro estudo, Prasad e Hao clonaram a DTS de SV40 em vários vetores de expressão eucariótica contendo um gene repórter sob controle do promotor pCMV e realizaram experimentos de transfecção em várias linhagens celulares, inclusive células CHO, as mesmas utilizadas neste trabalho. Estes pesquisadores observaram que a incorporação da DTS não foi capaz de aumentar os níveis de expressão gênica em vários dos tipos celulares e plasmídeos testados. Eles então concluíram que as diferenças entre a expressão gênica a partir daquelas construções poderia ser devido à atividade variável de importação nuclear da DTS de SV40 de uma maneira tipo celular e construção plasmideana específica (Prasad e Hao, 2005).

Recentemente, Sacramento e colaboradores, pesquisando os efeitos da DTS de SV40 por meio de análises quantitativas de importação nuclear e expressão gênica, viram que a eficiência destes dois processos era afetada inclusive por diferentes condições de disponibilidade de oxigênio no meio, sendo que a presença da DTS em plasmídeos sob condição de hipóxia não teve efeito adicional ou mesmo levou a diminuição da expressão gênica (Sacramento *et al.*, 2010).

Sendo assim, os resultados aqui obtidos e apresentados, aliados aos reportados pela literatura, sugerem que o aumento da expressão gênica possa depender da presença da DTS de SV40 nos plasmídeos, mas não somente disto; eventos subsequentes à captação nuclear relacionados à transcrição e tradução e mesmo o tipo celular e as condições fisiológicas a que estejam submetidas estas células é que parecem ser os fatores determinantes.

Em suma, a presença da DTS no plasmídeo pValac não foi capaz de conduzir aumento de sua importação nuclear e tampouco da expressão da ORF repórter GFP, em modelo de células CHO. Apesar destes resultados, e considerando as conclusões a que chegaram alguns pesquisadores, de que tal efeito promissor da DTS possa ser dependente do tipo celular utilizado, será dada continuidade a este trabalho, onde experimentos futuros de transfecção do referido plasmídeo em outra linhagem celular (Caco-2) serão realizados. A escolha das células Caco-2 se deve ao fato de que em todos os trabalhos acima mencionados, muitas linhagens celulares foram testadas, mas não esta.

5.2.4 Ensaios de transcrição reversa e RT-PCR

5.2.4.1 Extração do RNA total

Como já mencionado na seção “Materiais e Métodos”, no intuito de comparar os resultados obtidos por citometria de fluxo com experimentos futuros de análise de expressão diferencial através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), buscou-se primeiramente neste trabalho padronizar os experimentos de extração do RNA total. Essa padronização se fez necessária uma vez que a obtenção de amostras de RNA isentas de contaminação por DNA, sobretudo por DNA plasmideano, é um processo relativamente complicado.

A extração de RNA total foi realizada empregando-se o *kit RNeasy[®] Mini* (Qiagen), utilizando células transfectadas com o plasmídeo produto deste trabalho, pValac::DTS::gfp. Segundo o próprio fabricante, este *kit* baseia-se em propriedades de ligação seletiva de uma membrana de sílica, a qual se liga o RNA total, sendo os contaminantes (por exemplo, DNAs), eficientemente eliminados. No caso de amostras com alto conteúdo de DNA (como é

o caso de células que passaram por processos de transfecção com DNA plasmideano), é recomendado, durante o protocolo de extração, que as amostras sejam submetidas a duas reações de digestão com DNase livre de RNases: uma pela adição direta desta enzima na membrana de sílica e a outra, ao final da extração, após o RNA ter sido eluído.

A extração do RNA total, bem como os tratamentos com DNase, a fim de eliminar possíveis contaminações por DNA genômico e plasmideano, foi realizada conforme preconizou o fabricante. O rendimento da extração se mostrou satisfatório, tendo sido alcançada uma concentração de 236 ng/μL e sendo possível também verificar em gel de agarose a presença das bandas 28S e 18S do rRNA, evidenciando assim a integridade do RNA extraído. No que diz respeito à pureza deste material, mesmo após as duas reações de digestão com a enzima DNase ter sido feitas, a contaminação da amostra pelo DNA plasmideano se mostrava ainda bastante evidente, visualizada através de uma reação de PCR na qual foi usada a amostra de RNA extraído como molde (Fig. 17).

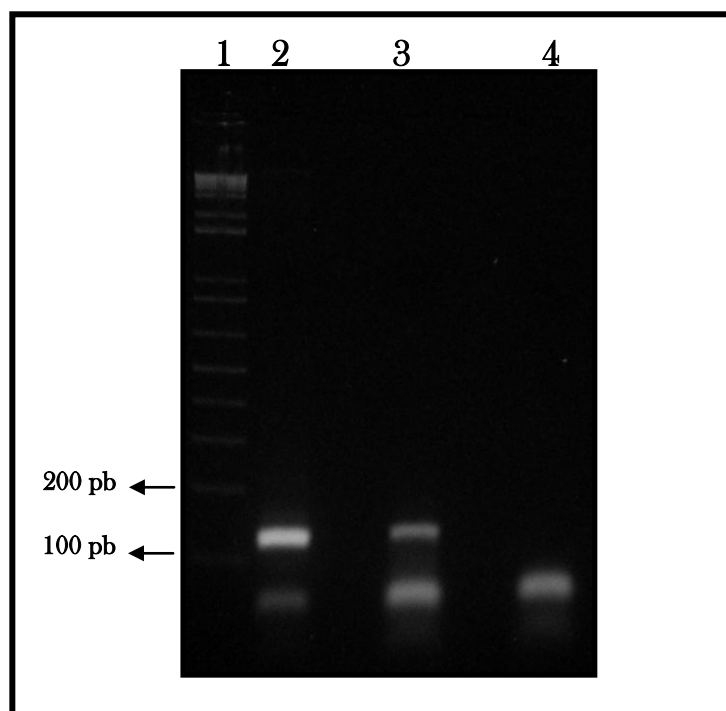


Figura 17: Verificação de contaminação por DNA plasmideano da amostra de RNA extraído, através de PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle positivo (pValac::DTS::gfp); Canaleta 3: Produto de PCR obtido a partir do RNA total extraído, evidenciando a amplificação de um fragmento interno de 127 pb da ORF GFP; Canaleta 4: Controle negativo. Primers utilizados nas reações: GFP int F e R (Tabela 3).

Assim sendo, nova digestão do material foi realizada, onde foi observada uma redução significativa no sinal de amplificação por PCR, tendo como molde esta amostra. Contudo, a eliminação definitiva da contaminação do RNA pelo plasmídeo só foi alcançada quando este

foi tratado com DNase à 37°C, durante 30 minutos (o *kit* não aconselha o processamento da reação em condição diferente da que ele preconiza, ou seja, incubação da reação com DNase à temperatura ambiente, durante 10 a 15 minutos).

5.2.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e RT-PCR

Uma vez obtido o RNA numa concentração satisfatória e principalmente, isento de contaminações por DNA, seguiu-se com a reação de síntese do cDNA complementar e submissão deste produto a uma reação de RT-PCR. De acordo com a Figura 18, pode-se observar que o RNA extraído foi eficientemente convertido em cDNA, uma vez que ao submeter o produto da reação de transcrição reversa a uma reação de RT-PCR utilizando os primers GFP int F e R, este demonstrou amplificação do fragmento interno de 127 pb da ORF GFP (Canaleta 5). A mesma amplificação foi vista no controle positivo da reação, onde se utilizou o plasmídeo pValac::DTS::*gfp*. A amostra de RNA extraído também foi usada nesta reação, e, como esperado, não houve nenhuma amplificação, assim como no controle negativo, ao qual foi adicionada água ultrapura estéril ao invés de ácido nucleico.

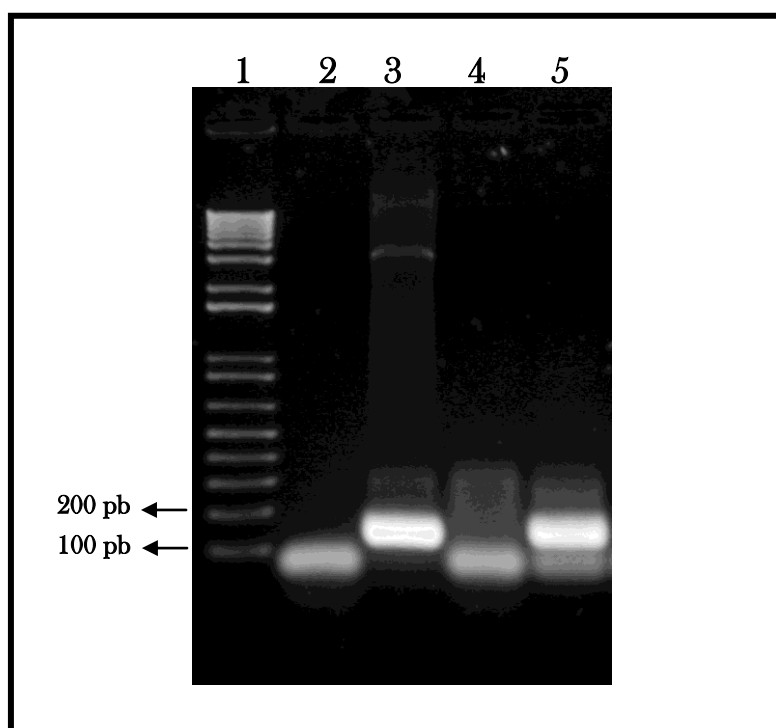


Figura 18: Produtos de RT-PCR obtidos a partir do RNA total convertido ou não em cDNA, extraído de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::DTS::*gfp*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Controle positivo (pValac::DTS::*gfp*); Canaleta 4: Produto de RT-PCR obtido a partir da utilização do RNA total extraído, como molde; Canaleta 5: Produto de RT-PCR obtido através da utilização do cDNA sintetizado a partir do referido RNA.

Deste modo, tendo sido padronizadas as reações de extração de RNA, eliminação dos DNAs contaminantes das amostras e a reação de transcrição reversa, existe a perspectiva de realização de reações de qPCR a fim de, como anteriormente mencionado, comparar os resultados destes experimentos com aqueles já obtidos por Citometria de Fluxo.

5.3 CONSTRUÇÃO DA LINHAGEM DE *L. lactis* FnBPA⁺ CONTENDO O PLASMÍDEO pValac::DTS::gfp

5.3.1 Obtenção da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA⁺(pValac::DTS::gfp)

Concomitantemente aos experimentos de confirmação da funcionalidade da construção pValac::DTS:gfp *in vitro*, este plasmídeo, extraído do clone de *E. coli* previamente confirmado, foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA, gerando a linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::DTS::gfp).

A seleção das colônias de *L. lactis* transformadas com o referido plasmídeo foi realizada em meio M17-Sac-Gli ágar suplementado com Cm e Ery. Passadas 20 horas de incubação à 30°C, foram observadas dezenas de colônias resistentes aos antibióticos mencionados, sendo que cinco delas foram selecionadas e todas apresentaram crescimento após inóculo em meio líquido seletivo. Estes possíveis clones foram então estocados em glicerol e submetidos à extração plasmideana. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de eletroporação.

Posteriormente, os DNAs plasmideanos extraídos foram utilizados como molde em reações de PCR, utilizando iniciadores específicos para a DTS de SV40 e para amplificação de parte da ORF FnBPA (DTS F/DTS R e FnBPA F/ FnBPA R, respectivamente; Tabela 3). Os cinco DNAs plasmidiano extraídos apresentaram amplificação de ambas as sequências. Os controles negativos, aos quais foi adicionada apenas água ultrapura estéril no lugar de plasmídeo, não demonstraram quaisquer sinais de amplificação. Por conseguinte, ficou confirmada a obtenção da linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac::DTS::gfp. Na figura 19 é possível visualizar o DNA plasmideano extraído a partir de um dos clones bem como a confirmação do mesmo, através de PCR.

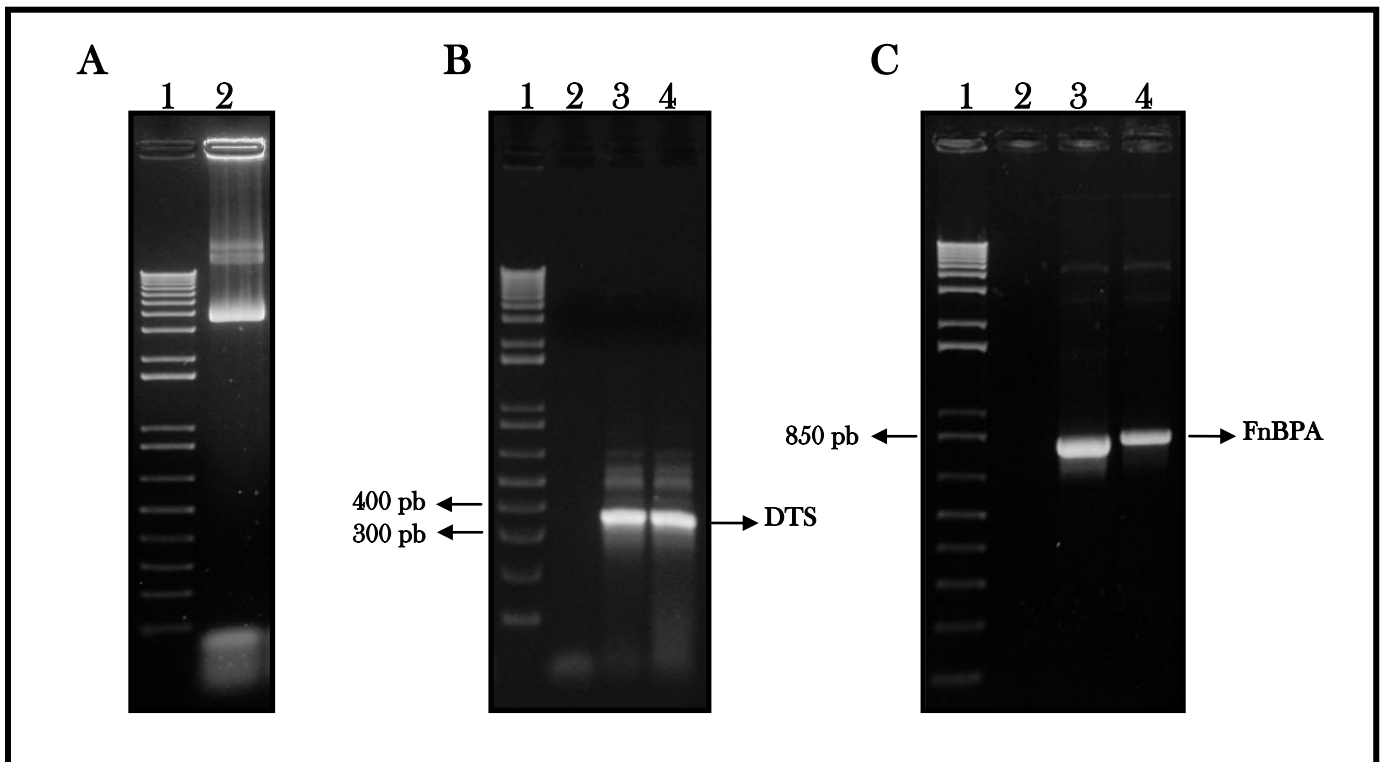


Figura 19: Confirmação da obtenção da linhagem *L. lactis* FnBPA⁺(pValac::DTS::gfp). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. **A) Produto de extração plasmideana de *L. lactis* FnBPA⁺(pValac::DTS::gfp)** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto de extração plasmideana de um dos clones *L. lactis* FnBPA⁺ pValac::DTS::gfp. **B) Amplificação da Sequência de Endereçamento Nuclear (DTS).** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Controle positivo (pJ204); Canaleta 4: Confirmação do clone apresentado em "A", por amplificação da DTS (322 pb). **C) Amplificação da ORF FnBPA.** Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Controle positivo (pOri23-*fnbpa*); Canaleta 4: Confirmação do clone apresentado em "A", por amplificação de parte da ORF FnBPA (807 pb).

Enfim, apesar de os dados obtidos neste trabalho não terem reportado diferenças significativas nos níveis tanto de eficiência de transfecção, quanto de expressão gênica, dados por construções plasmideanas em que a DTS de SV40 estava presente (pValac::DTS::gfp) ou não (pValac::gfp), será dada continuidade à avaliação dos possíveis efeitos promissores da presença desta sequência no vetor pValac por meio de sua transfecção em outras linhagens celulares, uma vez que, como já foi mencionado anteriormente, tais efeitos podem ser dependentes do tipo celular utilizado. Assim, a partir dos resultados destes experimentos, será considerada a utilização da linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::DTS::gfp), aqui construída, em estudos posteriores que envolvam a entrega deste vetor, *in vivo*.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

- A Sequência de Endereçamento Nuclear de SV40 foi clonada no vetor pValac::*gfp* e a construção pValac::*DTS::gfp* foi confirmada por reações de PCR, digestão enzimática e sequenciamento;
- O plasmídeo pValac::*DTS::gfp* mostrou-se funcional em células eucarióticas, sendo a ORF repórter GFP expressa em células transfectadas com este vetor, situação verificada por Microscopia de Fluorescência e RT-PCR. Para este último protocolo, foi alcançada também a padronização de extração de RNA sem contaminação por DNA genômico e plasmideano;
- A presença da DTS de SV40 no plasmídeo pValac::*DTS::gfp* não foi capaz de aumentar os níveis de expressão gênica em células CHO transfectadas com o mesmo, em comparação à expressão gênica obtida a partir do plasmídeo pValac::*gfp*, que não contém essa sequência.
- A linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac::*DTS::gfp*) foi obtida.

6.2 PERSPECTIVAS

- Ensaios de análise de expressão gênica através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para comparação com os dados obtidos por Citometria de Fluxo;
- Avaliação da expressão de GFP por células Caco-2 transfectadas com o plasmídeo pValac::*DTS::gfp*, uma vez que não existem relatos na literatura da utilização desta linhagem celular em estudos relacionados ao aumento da expressão gênica conduzida pela DTS de SV40.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacal, N.S.; Faulhaber, M.H.W. (2003). Introdução à Citometria de Fluxo, cap.1 In: *Aplicação prática em Citometria de Fluxo*. São Paulo: Editora Atheneu.
- Badger, C.V. *et al.* (2011). Development and application of a flow cytometric potency assay for DNA vaccines. *Vaccine*. 29: 6728-6735.
- Bagarazzi, M.L. *et al.* (1997). Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *J. Med. Primatol.* 26: 27-33.
- Bahey-El-Din M.; Gahan C.G.; Griffin B.T. (2010). *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr. Gene Ther.* 10: 34-45.
- Becker, P.D.; Noerder, M.; Guzmán, C.A. (2008). Genetic immunization: bacteria as DNA vaccine delivery vehicles. *Hum. Vaccin.* 4(3): 189-202.
- Bermúdez-Humarán, L.G. *et al.* (2003). Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect. Immun.* 71: 1887–1896.
- Bermúdez-Humarán, L.G.; Corthier, G.; Langella, P. R. (2004). Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology.* 8: 147-160.
- Bertho, A.L. (2007). Citometria de fluxo. Apostila Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Disponível em <<http://picf.ioc.fiocruz.br/>> Acesso em set/2011.
- Bodles-Brakhop, A.M.; Heller, R.; Draghia-Akli, R. (2009). Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: Current Clinical Developments. *Molecular Therapy.* 17(4): 585–592.
- Bolotin, A. *et al.* (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731–753.

Bråve, A. *et al.* (2011). Plasmid DNA vaccination using skin electroporation promotes poly-functional CD4 T-cell responses. *Immunology and Cell Biology*. 89: 492-496.

Brunner, S. *et al.* (2000). Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*. 7: 401-407.

Burgess, C. *et al.* (2004). Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin-enriched foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5769–5777.

Capecchi, M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22: 479–488.

Capone, S. *et al.* (2006). Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. *J. Immunol.* 177: 7462-71.

Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281–370.

Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 113–130.

Chatel, J.M. *et al.* (2008). *In vivo* transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther*. 15(16): 1184-1190.

Ciolina, C. *et al.* (1999). Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjug. Chem.* 10: 49–55.

Coban, C. *et al.* (2011). Novel Strategies to Improve DNA Vaccine Immunogenicity. *Current Gene Therapy*. 11: 479-484.

Courvalin, P.; Goussard, S.; Grillot-Courvalin, C. (1995). Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R. Acad. Sci. III*. 318: 1207–1212.

Cox, G.J.M.; Zamb, T.J.; Babiuk, L.A. (1993). Bovine herpesvirus 1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Journal of Virology*. 67: 5664–5667.

- Daudel, D.; Weidinger, G.; Spreng, S. (2007). Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. 6: 97-110.
- Davidson, A.H. *et al.* (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226: 240–245.
- Davis, B.S. *et al.* (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses *in vitro* a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75:4040–4047.
- de Vos, W.M. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 289-295.
- De Vuyst, L.; Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- Dean, D.A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp. Cell Res.* 230: 293–302.
- Dean, D.A. (1998). Molecule and method for importing DNA into a nucleus. South Alabama Medical Science Foundation, Mobile, Ala. United States Patent Number 5,827,705; 27 oct. 1998.
- Dean, D.A. *et al.* (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* 253: 713-722.
- Delavallée, L. *et al.* (2008). Vaccination with cytokines in autoimmune diseases. *Annals of Medicine*. 40: 343-351.
- Diniz, M.O.; Ferreira, L.C.S. (2010). Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*. 24(70): 19-30.
- Dunham, S.P. (2002). The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res. Vet. Sci.* 73: 9–16.

Fasbender, A. *et al.* (1997). A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther.* 4: 1173–1180.

Faurez, F. *et al.* (2010). Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine.* 21;28(23): 3888-3895.

Ferrera, F. *et al.* (2007). Gene vaccination for the induction of immune tolerance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1110: 99-111.

Fuller, D.H.; Loudon, P.; Schmaljohn, C. (2006). Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods.* 40: 86-97.

Funabashi, H. *et al.* (2010). Sox2 regulatory region 2 sequence works as a DNA nuclear targeting sequence enhancing the efficiency of an exogenous gene expression in ES cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 400(4): 554-558.

Fynan, E.F. *et al.* (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11478–11482.

Gaillard, J.L. *et al.* (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell.* 65: 1127–1141.

Graessman, M.; Graessman, A. (1986). Microinjection of tissue culture cells using glass microcapillaries: methods, in: J.E. Celis, A. Graessmann, A. Loyter (Eds.), *Microinjection and Organelle Transplantation Techniques: Methods and Applications*, Academic Press, London 3–37.

Guimarães, V.D. *et al.* (2005). Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes and Infection.* 7: 836–844.

Guimarães, V.D. *et al.* (2006). Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(11): 7091-7097.

Guimarães, V.D. *et al.* (2009). A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy*. 7:4.

Gurunathan, S. *et al.* (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 442-447.

Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 927-974.

Hoebe, K.; Janssen, E.; Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5 (10): 971-974.

Hughenoltz, J. *et al.* (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82 (1-4): 217-35.

Ingolotti, M. *et al.* (2010). DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev. Vaccines*. 9(7): 747-763.

Innocentin, S. *et al.* (2009). *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (14): 4870-4878.

Izadpanah, A. *et al.* (2001). Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280(4): G710-719.

Jones, N.C.; Rigby, P.W.; Ziff, E.B. (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* 2: 267-281.

Júnior, J.M.R. *et al.* (2004). É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *J. Bras. Pneumol.* 30(4): 378-387.

Kano, F.S.; Vidotto, O.; Vidotto, M.C. (2007). *Ciências Agrárias*, Londrina; 28(4): 709-726.

Klaenhammer, T.R. *et al.* (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(3): 393-409.

Klinman, D.M. *et al.* (2000). DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol.* 104:45–51.

König, H.; Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. (Eds.) H. König; G. Uden; J. Fröhlich, XVIII, 522 p.; pp. 3-29 Springer, Heidelberg.

Kurth, R. (1995). Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 772:140–151.

Kutzler, M.A.; Weiner, D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 9:776-788.

Kwon, S. *et al.* (2001). High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell recycle bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 73:25–34.

Lam, A.P.; Dean, D.A. (2010). Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Therapy* 17: 439–447.

Lange, A. *et al.* (2007). Classical Nuclear Localization Signals: Definition, function and interaction with importin α . *The Journal Of Biological Chemistry.* 282(8): 5101-5105.

Langle-Rouault, F. *et al.* (1998). Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein–Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids. *J. Virol.* 72: 6181–6185.

Le, T.P. *et al.* (2000). Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine.* 18: 1893-1901.

Lebrun, M. *et al.* (1996). Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 21: 579–592.

Lechardeur, D. *et al.* (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* 6: 482- 497.

Lechardeur, D.; Lukacs, G.L. (2006). Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum. Gene Ther.* 17: 882–889.

Lecuit, M. *et al.* (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.* 292: 1722-1725.

Ledwith, B.J. *et al.* (2000). Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 43: 258–272.

Li, S. *et al.* (2001). Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Therapy.* 8: 494-497.

Liu, M.A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews.* 239: 62-84.

Liu, M.A.; Ulmer, J.B. (2005). Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv. Genet.* 55: 25–40.

Lori, F.; Calarota, S.A.; Lisziewicz, J. (2007). Nanochemistry-based immunotherapy for HIV-1. *Curr. Med. Chem.* 14(18): 1911-1919.

Lowrie, D.B. *et al.* (1997). Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine.* 15(8): 834-838.

MacGregor, R.R. *et al.* (1998). First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Infect. Dis.* 178: 92–100.

MacGregor, R.R. *et al.* (2000). Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. *J. Infect. Dis.* 181:406.

- Makarova, K.S.; Koonin, E.V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 189:1199–1208.
- Manam, S. *et al.* (2000). Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology.* 43: 273–281.
- Mercenier, A.; Muller-Alouf, H.; Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2(1): 17-25.
- Mesika, A. *et al.* (2001). A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther.* 3: 653–657.
- Miller, A.M. *et al.* (2009). Identification of protein cofactors necessary for sequence-specific plasmid DNA nuclear import. *Molecular Therapy.* 17(11): 1897–1903.
- Miller, A.M.; Dean, D.A. (2009). Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 603–613.
- Mirzayans, R.; Remy, A.A.; Malcom, P.C. (1992). Differential expression and stability of foreign genes introduced into human fibroblasts by nuclear versus cytoplasmic microinjection. *Mutat. Res.* 281: 115–122.
- Mortimer, I. *et al.* (1999). Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther.* 6: 403- 411.
- Nagasaki, T. *et al.* (2005). Enhanced nuclear import and transfection efficiency of plasmid DNA using streptavidin-fused importin-beta. *J. Control. Release.* 103: 199–207.
- Neutra, M.R.; Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev. Immunol.* 6: 148-158.
- Nordström, E.K.L. *et al.* (2005). Enhanced immunogenicity using an alphavirus replicon DNA vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology.* 86: 349–354.

Nouaille S. *et al.* (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 31;2(1): 102-111.

Oliveira, S.C. (2004). Vacinas de DNA, cap. 24 (p. 495-511) In *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

Pal, R. *et al.* (2006). Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine*. 24: 1225-1234.

Peek, L.J.; Middaugh, C.R.; Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 915-928.

Pereira, V.B. (2011). Construção e avaliação funcional de um plasmídeo vacinal para a expressão do antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* em células mamíferas, utilizando uma bactéria láctica invasiva como veículo carreador. 109 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Genética, Belo Horizonte.

Pichon, C.; Billiet, L.; Midoux, P. (2010). Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21(5): 640-645.

Pokorna, D.; Rubio, I.; Muller, M. (2008). DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genetic Vaccines and Therapy*. 6(4): 1-8.

Pontes, D.S. *et al.* (2011). *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr. Purif.* 79(2): 165-175.

Prasad, T.K.; Rao, N.M. (2005). The role of plasmid constructs containing the SV40 DNA nuclear-targeting sequence in cationic lipid-mediated DNA delivery. *Cell Mol. Biol. Lett.* 10(2):203-215.

Que, Y. A. *et al.* (2001). Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.* 69: 6296-6302.

Rahman M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Oxford, UK: Serotec Ltd;16-23. Disponível em <<http://www.abdserotec.com/uploads/flow-cytometry.pdf>.> Acesso em set/2011.

Rebuffat, A. *et al.* (2001). Selective enhancement of gene transfer by steroid-mediated gene delivery. *Nat. Biotechnol.* 19: 1155–1161.

Rebuffat, A.G. *et al.* (2002). Gene delivery by a steroid-peptide nucleic acid conjugate. *FASEB J.* 16: 1426–1428.

Reid, G. *et al.* (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658–672.

Sacramento, C.B. *et al.* (2010). Gene expression promoted by the SV40 DNA targeting sequence and the hypoxia-responsive element under normoxia and hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43(8): 722-727.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanders, M.E. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61(3): 91-99.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

Schaffner, W. (1980). Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 2163–2167.

Schoen, C. *et al.* (2004). Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 319-335.

Sebestyén, M.G. *et al.* (1998). DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA, *Nat. Biotechnol.* 16: 80–85.

Sheets, R.L. *et al.* (2006). Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol. Sci.* 91(2): 610–619.

Silva, C.L. *et al.* (2004). Vacinas Gênicas, cap. 23 (p. 463-494) In *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

Sinha, B. *et al.* (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68: 6871-6878.

Sizemore, D.R.; Branstrom, A.A.; Sadoff, J.C. (1995). Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science*. 270: 299–302.

Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70: 331–345.

Taguchi, S. *et al.* (2008). A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105(45): 17323–17327.

Tang, D.C; DeVit, M.; Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 356: 152–154.

Taranto, M.P. *et al.* (2003). *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J. Bacteriol.* 185: 5643–5647.

Temin, H.M. (1990). Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J. Med. Virol.* 31(1): 13–17.

Ulmer, J.B. *et al.* (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 259: 1745–1749.

Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.* 5: 877–903.

Vacik, J. *et al.* (1999). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6:1006–1014.

van de Guchte, M. *et al.* (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 13;103(24): 9274-9279.

van den Berg, J.H. *et al.* (2009). Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Human Gene Therapy.* 20: 181–189.

van Gaal, E.V.B *et al.* (2011). DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery. *Pharm. Res.* 28: 1701-1722.

Vanniasinkam, T.; Reddy, S.T.; Ertl, H.C. (2006). DNA immunization using a non-viral promoter. *Virology.* 344: 412-420.

Vasan S. *et al.* (2011). *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS ONE.* 6(5): e19252.

Vassaux, G. *et al.* (2006). Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol.* 208(2): 290-298.

Vaughan, E.E.; Dean, D.A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Molecular Therapy.* 13(2): 422–428.

Vaysse, L. *et al.* (2004). Development of a self-assembling nuclear targeting vector system based on the tetracycline repressor protein. *J. Biol. Chem.* 279: 5555–5564.

Wang, B. *et al.* (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4156–4160.

Watabe, S. *et al.* (2001). Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine.* 19: 4434-4444.

Wells, J. (2011). Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2: 423-445.

Wells, J.M.; Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature.* 1038: 1-14.

Welman, A.D.; Maddox, I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21: 269–274.

Widera, G. *et al.* (2000). Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*. *J. Immunol.* 164: 4635-4640.

Williams, J.A.; Carnes, A.E.; Hodgson, C.P. (2009). Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.* 27(4): 353–370.

Wilson, G.L. *et al.* (1999). Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *The Journal of Biological Chemistry.* 274(31): 22025-22032.

Xiang, Z.Q. *et al.* (1994). Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology.* 199: 132-140.

Xu, Z.L. *et al.* (2002). Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *Journal of Controlled Release.* 81: 155-163.

Young, J.L.; Benoit, J.N.; Dean, D.A. (2003). Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Therapy.* 10: 1465-1470.

Young, J.L.; Zimmer, W.E; Dean, D.A. (2008). Smooth Muscle-Specific Gene Delivery in the Vasculature Based on Restriction of DNA Nuclear Import. *Experimental Biology and Medicine.* 233: 840-848.

Zabner, J. *et al.* (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(32): 18997-19007.

Zaharoff, D.A. *et al.* (2002). Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 9: 1286-1290.

Zhou, R. *et al.* (2007). Electroporation-mediated transfer of plasmids to the lung results in reduced TLR9 signaling and inflammation. *Gene Ther.* 14: 775–780.