

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
NEFROLOGIA
Mestrado e Doutorado**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES
PARA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA EM
TRANSPLANTE**

Dissertação de Mestrado

Florencia María Barbé Tuana

**Porto Alegre
2002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
NEFROLOGIA
Mestrado e Doutorado

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA
INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA EM TRANSPLANTE

Florencia María Barbé Tuana

Dissertação de Mestrado apresentada como
Requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas: Nefrologia

Orientador: Professor Doutor David Saitovitch
Co-Orientadora: Professora Doutora Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre
2002

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Enrique e Kitty e meus irmãos Nicolás e Valentina, pelo enorme apoio durante todo este tempo fora. Pelo imensurável carinho, atenção, e suporte em todos os aspectos. Por me fazerem sentir em casa.

Agradeço ao meu marido Marcus, a quem admiro e amo profundamente.

Agradeço ao meu orientador Doutor David Saitovitch, idealizador deste projeto. David foi um orientador de excepcional criatividade e visão que constantemente me estimulou a superar as dificuldades desta pesquisa. Excelente pessoa e amigo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da UFRGS, na figura dos Doutores Roberto Ceratti Manfro, Luiz Felipe Gonçalves e, em especial ao Doutor Elvino Barros por ter apoiado o ingresso de não-médicos no curso.

Agradeço à minha co-orientadora Doutora Denise Cantarelli Machado, quem me acolheu no seu laboratório e me permitiu, de modo incondicional, a utilização de todos os recursos ali disponíveis. Agradeço novamente a Denise pela enorme paciência, tempo de discussão, enorme carinho, amizade sincera. Um modelo de profissional, devoção à ciência e mulher!

Excluído: , e divertidíssimas saídas

Agradeço à Doutora Kathryn J. Wood do Nuffield Department of Surgery, Universidade de Oxford (Inglaterra), pela doação do plasmídeo pBluescriptSK::K^b.

Agradeço ao diretor do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica, Doutor Jaderson Costa da Costa, por ter me permitido a realização desse trabalho em um lugar tão agradável e produtivo.

Agradeço ao Doutor Diógenes Santiago Santos e ao seu grupo de trabalho pela intensa colaboração com materiais, e a utilização da sua sala de cultura para finalizar esse trabalho.

Agradeço ao Doutor Jomar P. Laurino e ao seu grupo de trabalho pela realização dos seqüenciamentos.

Agradeço à Doutora Cristina Bonorino e ao seu grupo de trabalho, especialmente Luiz Carlos Rodrigues Júnior, pela colaboração nesse trabalho.

Agradeço à Doutora Virgínia Minghelli Schmitt pela colaboração nesse trabalho.

Agradeço à Farmacéutica Ana Cristina Dias pela colaboração nesse trabalho.

Agradeço aos meus colegas do programa de pós-graduação e aos meus colegas e grandes amigos do laboratório: Daniela Roth, Vinícius Michaelssen, Taísa Ermel, Bibiana de

Aguiar, Giancarlo Munaretto, Christian Viezzer, Renata Stringhini, Paulo Jobim e Rosely Petry.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Sra. Rute Santos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissionais de Nível Superior (CAPES), pelo apoio na concessão da bolsa de pós-graduação e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	III
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. TOLERÂNCIA EM TRANSPLANTE.....	1
1.2. TERAPIA GÊNICA.....	11
1.3. VETORES UTILIZADOS.....	12
1.4. GENES DE INTERESSE EM TRANSPLANTE.....	16
1.5. VP22: FERRAMENTA ALTERNATIVA COMO VIA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS EXÓGENAS.....	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Obtenção do inserto K^b	30
3.1.1. Primeira estratégia de clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His	30
3.1.2. Análise e documentação dos géis de agarose.....	32
3.1.3. Extração do inserto K^b do gel de agarose.....	32
3.1.4. Clonagem do inserto K^b no plasmídeo pCIneo.....	33
3.1.5. Preparação de células eletrocompetentes para transformação com os plasmídeos	35
3.1.6. Transformação de <i>E. Coli</i> Top10 com pCIneo:: K^b por choque elétrico...35	
3.1.7. Análise dos clones recombinantes Top10/pCIneo:: K^b	36
3.1.8. Clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His	36
3.1.9. Análise dos clones recombinantes Top10/pVP22:: K^b	38
3.2. Segunda estratégia de clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His.....	39

3.2.1. Extração de RNA total de camundongo C57BL/6.....	39
3.2.2. Transcrição reversa a partir do RNA total	40
3.2.3. Otimização das condições da reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
3.2.4. Extração dos produtos de PCR K^bA e K^bB do gel	42
3.2.5. Reação de ligação dos produtos K^bA e K^bB com o plasmídeo pCR-Blunt-II-TOPO	43
3.2.6. Transformação de <i>E. coli</i> Top10 com pCRBlunt:: K^b por choque térmico	44
3.2.7. Análise dos clones recombinantes pCRBlunt:: K^b	44
3.2.8. Seqüenciamento automático dos clones pCRBlunt:: K^b	45
3.2.9. Clonagem do fragmento K^b nos plasmídeos pVP22/myc-His e pCIneo ...	46
3.2.10. Transformação de <i>E. coli</i> Top10 com pVP22:: K^b e pCIneo:: K^b	47
3.2.11. Análise dos clones recombinantes Top10/pVP22:: K^b e Top10/pCIneo:: K^b	47
3.2.12. Seqüenciamento automático dos clones Top10/pVP22:: K^b e Top10/pCIneo:: K^b	47
3.2.13. Cultura de células de câncer de ovário de <i>hamster</i> (CHO-K1).....	48
3.2.14. Transformação de CHO com Top10/pVP22:: K^b e Top10/pCIneo:: K^b ...	49
3.2.15. Extração do RNA total das células em cultura.....	49
3.2.16. Tratamento do RNA com a enzima DNase I	50
3.2.17. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase.....	50
3.2.18. Citometria de fluxo para a detecção da expressão da proteína K^b	51
3.2.19. Imunofluorescência para detecção da proteína K^b	52
4. RESULTADOS.....	53
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	104

RESUMO

As vacinas de DNA têm sido utilizadas para a indução de imunidade contra antígenos virais e bacterianos. A aplicação de modelos experimentais tem sido explorada visando a indução de tolerância imunológica através da expressão de genes cujos produtos podem modular o sistema imune para um estado de não responsividade. A terapia gênica oferece a possibilidade de manipulação do sistema imune do receptor, através de um sistema de administração de genes específicos sob condições pré-definidas. Sua eficácia depende dos níveis de expressão e da natureza do antígeno, da via de administração assim como de sua distribuição nos tecidos (a qual às vezes depende do promotor utilizado). Porém, sua aplicação clínica é limitada em parte devido aos baixos níveis de expressão obtidos *in vivo*.

A VP22 é uma proteína do tegumento do vírus *Herpes simplex* tipo 1, que tem a propriedade de fazer tráfego intercelular. Estudos recentes têm demonstrado a alta eficiência desta molécula no transporte de proteínas heterólogas como VP22-p53, VP22-β galactosidase e VP22-proteína verde fluorescente.

Para a indução de tolerância imunológica, tem sido demonstrado que a persistência do antígeno, pelo menos por algum período, é muito importante. Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) têm sido utilizadas para induzir tolerância a nível central ou periférico, em diferentes protocolos. Dentre estas, as moléculas da classe I do camundongo, K^b , têm sido utilizadas com sucesso.

Excluído: do classe

O objetivo desse trabalho foi de construir duas vacinas recombinantes: pVP22:: K^b e pCIneo:: K^b . A primeira contém dois genes clonados na mesma pauta de leitura: a cadeia pesada de classe I K^b e VP22.

O cDNA que codifica para o K^b foi obtido pela extração de RNA total de baço de um camundongo C57BL/6 (haplótipo H-2^b) seguido de transcrição reversa. Este produto foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase. Esta molécula também foi obtida pela amplificação direta do gene K^b previamente clonado no sítio *EcoR* I do plasmídeo pBluescriptIISK (Stratagene®). Ambos os produtos de PCR foram subclonados com extremidades cegas no plasmídeo pCRBluntII (Invitrogen®). Foram obtidos dezenove plasmídeos recombinantes, denominados pCRBluntII:: K^b , e um deles foi escolhido e digerido com as enzimas de restrição *Spe* I e *Xba* I e defosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIAP). O fragmento digerido foi clonado nos plasmídeos pVP22-*myc*/His (Invitrogen®) e pCIneo (Promega®) previamente digeridos com a enzima *Xba* I.

Os novos plasmídeos pVP22:: K^b e pCIneo:: K^b foram utilizados para transfectar a linhagem celular eucariótica CHO. A expressão do mRNA para o K^b foi confirmada pela transcrição reversa e PCR e a expressão da proteína por imunofluorescência e citometria de fluxo.

ABSTRACT

DNA vaccines have been increasingly used for the induction of immunity against viral and bacterial antigens. Experimental models have been explored aiming its application for the induction of immunological tolerance through the expression of genes whose products can modulate the immune system to a state of unresponsiveness. Gene therapy offers the possibility of manipulating a recipient's immune system through the delivery of specific genes under desired predefined conditions. Its efficacy depends on the expression level and nature of the antigen, route of administration as well as the tissue distribution (which sometimes depends on the promoter used). However, its clinical application is limited, in part due to the low levels of expression obtained *in vivo*.

VP22 is a protein from the tegument of type 1 *Herpes simplex virus*, which has the property of intercellular trafficking. Recent studies have demonstrated high efficiency of this molecule in the transport of heterologous proteins such as VP22-p53, VP22- β galactosidase and VP22-Green fluorescent protein.

For the induction of immunological tolerance, it has been demonstrated that donor antigen persistence, at least for a critical period of time, is very important. Molecules from the major histocompatibility complex (MHC) have been used to induce central or peripheral tolerance in different protocols. Among them, mouse class I MHC molecules K^b have been used successfully.

The aim of this work was to construct two recombinant DNA vaccines: pVP22:: K^b and pCIneo:: K^b . The former molecule contains two DNA molecules cloned in frame: the heavy chain of the class I molecule K^b and VP22.

The cDNA that encodes for K^b was obtained from total RNA extracted from a C57BL/6 mice spleen (H-2^b haplotype) followed by reverse transcription. This product was amplified by polymerase chain reaction. This molecule was also obtained by direct amplification of K^b gene, previously cloned in the *EcoR* I site of pBluescriptIIISK plasmid. Both PCR products were dephosphorilated with a calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) enzyme and subcloned with sticky ends in the pCRBluntII plasmid. Nineteen recombinant plasmids were obtained named pCRBluntII:: K^b . One of them was digested with the restriction enzymes *Spe* I e *Xba* I and dephosphorilated. The digested fragment was cloned into the pVP22-*myc*/His (Invitrogen®) and pCIneo plasmids previously digested with the *Xba* I restriction enzyme.

The new plasmids pVP22:: K^b and pCIneo:: K^b were used to transfect the eucariotic CHO cell line. The mRNA expression from the K^b gene was confirmed by reverse transcription and polymerase chain reaction. Protein expression was confirmed by immunofluorescence, and flow citometry analysis.

ABREVIATURAS

%	porcentagem
µm	micra
µF	microfarad
µg	micrograma
µl	microlitros
AAV	vírus adenoassociado
Ad	adenovírus
APC	célula apresentadora de antígenos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm	centímetros
CIAP	fosfatase alcalina do intestino de novilho
CHO	câncer de ovário de <i>hamster</i> chinês
CTLA4	antígeno 4 de linfócito T citotóxico
CTLA4Ig	antígeno 4 de linfócito T citotóxico 4-imunoglobulina
ddNTPs	dideoxirribonucleotídeos trifosfatados
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	Meio de Dulbecco modificado por Eagle
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	densidade ótica
dsDNA	DNA de fita dupla
DST	transfusão sanguínea específica do doador
DTT	dithiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	brometo de etídio
FBS	soro fetal bovino
FEPPS	Fundação Estadual de Produção em Pesquisa Animal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GCV	ganciclovir
GFP	proteína verde fluorescente
GVHD	doença do enxerto contra o hospedeiro
h	hora
H ₂ O	água
hDAF	fator de aceleração do decaimento humano
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígenos leucocitários de humano
HSV	vírus herpes simples
IFN-γ	interferon-γ
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
kV	kilovolt
LB	caldo de Lennox
M	molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MiAg	antígenos menores

min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
N ₂	nitrogênio
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanômetro
°C	graus centígrados
pb	pares de bases
PBS	salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
pM	picomolar
rcf	força centrífuga relativa
s	segundos
SB	super caldo
SDS	dodecilsulfato de sódio
ssDNA	DNA de fita simples
STAT	transdutor de sinais e ativador da transcrição
SV40	vírus de símio 40
TAE	Tris/Ácido acético/EDTA
TBE	Tris/Ácido bórico/EDTA
TE	Tris/EDTA
TK	timidina quinase
TLI	irradiação linfóide total
Tm	temperatura de fusão
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade
UV	ultravioleta
vIL-10	interleucina 10 viral
Ω	ohm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do plasmídeo pBluescript II SK (+/-) [®] (Stratagene) e seqüência do sítio de múltipla clonagem.....	31
Figura 2. Seqüência do gene H-2K ^b que codifica para a cadeia pesada α do MHC de classe I de camundongo	32
Figura 3. Representação esquemática do plasmídeo pCIneo [®] (Promega) e seqüência do sítio de múltipla clonagem	34
Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pVP22/Myc-His [®] (Invitrogen) e seqüência do sítio de múltipla clonagem	38
Figura 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene H-2K ^b	41
Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pCR [®] -Blunt II-TOPO e seqüência do sítio de múltipla clonagem	43
Figura 7. Digestão do plasmídeo pBluescriptII::K ^b com <i>EcoR</i> I.	53
Figura 8. Digestão do plasmídeo pCIneo::K ^b com <i>Not</i> I.	53
Figura 9. Seleção dos clones recombinantes pVP22::K ^b pela análise do padrão de restrição com <i>Not</i> I para determinação da correta orientação do fragmento K ^b em pVP22.....	54
Figura 10. Produto da extração de RNA do baço de um camundongo C57BL/6 (H2-K ^b) e transcrição reversa de ácidos ribonucléicos	55
Figura 11. Resultado da otimização da técnica de PCR para a amplificação do gene Kb de 1.137 pb.....	56
Figura 12. Produto da PCR gerado com a enzima polimerase <i>Pfx</i>	56

Figura 13. Padrão de digestão dos clones recombinantes pCRBluntII::K ^b gerados com <i>EcoR</i> I	57
Figura 14. Seqüenciamento automático do clone pCRBluntII::K ^b B7 com o oligonucleotídeo iniciador direto M13 (-20).....	59
Figura 15. Demonstração da presença da C35 no clone pCRBluntII::K ^b B7 por seqüenciamento automático	61
Figura 16. Seqüenciamento automático do clone pCRBluntII::K ^b B7 com o oligonucleotídeo iniciador reverso M13	62
Figura 17. Purificação do inserto K ^b a partir do clone seqüenciado pCRBluntII::K ^b B7 para posterior clonagem nos vetores pVP22 e pCIneo	64
Figura 18. Resultado da seleção dos clones recombinantes pela análise do padrão de restrição com <i>Kpn</i> I para determinação da correta orientação do fragmento K ^b em ambos plasmídeos pVP22::K ^b e pCIneo::K ^b	66
Figura 19. Demonstração da presença do gene K ^b no clone pCIneo::K ^b pelo método de seqüenciamento automático com o oligonucleotídeo iniciador direto T7 EEV	68
Figura 20. Demonstração da presença do gene K ^b no clone pCIneo::K ^b pelo método de seqüenciamento automático com o oligonucleotídeo iniciador reverso T3	69
Figura 21. Demonstração da presença do gene K ^b no clone pVP22::K ^b pelo método de seqüenciamento automático com o <i>primer</i> reverso pCDNA3.1	71
Figura 22. Produto da extração de RNA de células em cultura CHO	72
Figura 23. Transcrição reversa e PCR para os genes GAPDH e K ^b com amostras de células transfectadas.....	73
Figura 24. Gráfico de pontos resultante da análise por citometria de fluxo da expressão da proteína K ^b em células CHO em cultura não transfectadas.....	75

Figura 25. Gráfico de pontos resultante da análise por citometria de fluxo da expressão da proteína K^b em células CHO em cultura transfectadas com o plasmídeo pVP22 K^b e pCIneo K^b	76
Figura 26. Expressão intracelular da proteína K^b em células CHO em cultura transfectadas com os plasmídeos pVP22:: K^b e pCIneo K^b	77
Figura 27. Imunofluorescência indireta de células CHO em cultura com marcação simples para anticorpo específico para o K^b	79

1. INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos é o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal terminal, e, em muitos casos, é a única opção para pacientes com outras falências orgânicas terminais, como doença cardíaca ou hepática. Embora esse procedimento seja hoje um sucesso, com taxas de sobrevida no primeiro ano em torno de 95 % para receptores e 90 % para enxertos nos principais centros de referência (1), este sucesso não ocorre sem que haja um “preço a ser pago”. Drogas imunossupressoras devem ser empregadas de forma continuada para que não se desenvolva o processo de rejeição ao enxerto. Efeitos tóxicos diretos das drogas sobre diferentes órgãos-alvo ou aqueles secundários à imunossupressão inespecífica (como aparecimento de infecções oportunistas e/ou neoplasias) ocorrem freqüentemente nesta população de pacientes.

Ainda, apesar do excesso de imunossupressão, a terapia atual anti-rejeição não é suficientemente capaz de impedir o aparecimento de rejeição crônica ao enxerto, cujos mecanismos de formação envolvem principalmente anticorpos anti-enxerto pouco afetados por estas drogas.

Conseqüentemente, o grande desafio da era moderna dos transplantes de órgãos é o da indução e manutenção, no receptor, de tolerância imunológica. Uma vez atingido este estado, não seria necessária a administração de drogas imunossupressoras (ficando o paciente livre de toxicidade de drogas e também complicações infecciosas). Da mesma forma, ficariam os receptores livres da ocorrência de nefropatia crônica do enxerto, visto que não haveria nefrotoxicidade crônica secundária ao uso de inibidores de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), nem rejeição crônica (já que não ocorreria uma resposta imune anti-enxerto).

1.1. TOLERÂNCIA EM TRANSPLANTE

A indução de tolerância a um aloenxerto vascularizado em um receptor adulto parece envolver mecanismos complexos e foi inicialmente atingida experimentalmente há aproximadamente 30 anos pela transfusão passiva de anticorpos do doador (2) ou

mediante um pré-tratamento com antígenos do doador em forma de transfusão sanguínea específica do doador (DST) (3). Atualmente, várias estratégias têm sido relatadas, capazes de induzir hiporesponsividade específica, porém sempre é necessário algum tipo de pré-condicionamento (4).

Geralmente, os indivíduos a serem transplantados recebem órgãos alogênicos, isto é, órgãos que expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) geneticamente distintas das suas. Sem nenhum tipo de condicionamento, como por exemplo à administração de drogas imunossupressoras, o sistema imune do receptor irá rejeitar o enxerto. Esse processo de rejeição começa com o reconhecimento por parte dos linfócitos T CD4 do receptor, dos antígenos estranhos presentes no aloenxerto. Estes antígenos são codificados predominantemente por *loci* polimórficos presentes no MHC, no cromossomo 6, em humanos, denominados antígenos leucocitários humanos (HLA), e no cromossomo 17 de camundongos (denominado H-2) (5), e expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B ou células endoteliais (6). Estas proteínas, são as mais polimórficas encontradas no genoma humano, e acredita-se que a razão para a manutenção de tal grau de polimorfismo (5-17 %) seja a luta constante entre o sistema imune e os patógenos infecciosos (7). Os linfócitos T CD4 do receptor podem reconhecer moléculas do complexo MHC-peptídeo estranhas apresentadas pelas APC do doador que migraram aos linfonodos, mecanismo de reconhecimento direto. Alternativamente, estas células podem reconhecer peptídeos polimórficos derivados do aloenxerto que foram processados e apresentados pelas APC do receptor, mecanismo de reconhecimento indireto (8).

O conhecimento dos mecanismos de ativação dos linfócitos, centrais no processo de resposta imunológica, permite-nos desenvolver novas estratégias imunomoduladoras para interferir especificamente, quando necessário. Desta maneira, as intervenções que se focalizam na ativação de células T antígeno específicas constituem a meta final para o controle de complicações imunes na área de alotransplante.

Além disso, tem sido sugerido que a distinção entre o próprio e não próprio é fundamental no processo de evolução para a construção dos receptores de células B e T. Esta aceção está intimamente ligada ao fenômeno de tolerância imunológica, onde Paul Ehrlich e Morgenroth, descrevem em uma série de artigos que tratam do mecanismo de hemólise, animais capazes de formar anticorpos contra células vermelhas alogênicas e xenogênicas, mais jamais contra células isogênicas. Este fenômeno foi inicialmente explicado mediante a formulação da *teoria do horror autotóxico*, na qual um organismo normal não mobilizaria seus mecanismos imunológicos para efetuar uma reação destrutiva contra seus próprios tecidos (9).

Em 1945 Ray Owen (10) observou que gêmeos de novilhos não idênticos comportavam-se como quimeras. Foi observado que ocorria um intercâmbio de células hematopoiéticas entre estes embriões, que compartilhavam a mesma placenta. Assim, cada um destes animais quando adulto possuía os eritrócitos de seu tipo como os do outro tipo, porém não eram capazes de montar uma resposta imune ativa induzida contra as células estranhas. Estas observações contribuíram às formulações descritas por Burnet, nas quais afirma que a falha na produção de anticorpos contra células autólogas demanda a habilidade ativa das células do sistema retículo endotelial de reconhecer um padrão próprio do não próprio (9).

A tolerância aos antígenos próprios, é um mecanismo fisiológico, adquirido pelas células T imaturas durante sua passagem pelo timo. Porém, o mecanismo de não responsividade aos antígenos estranhos também pode ser induzido em animais cujo sistema imune ainda é imaturo. Este fenômeno foi demonstrado há 50 anos (1953) por Billingham, Brent e Medawar, descrevendo pela primeira vez o fenômeno de tolerância neonatal induzida a alotransplantes de pele. Neste estudo, foi confirmado experimentalmente em camundongo, a indução de tolerância pela inoculação *intra-útero* de células de outra linhagem, e posterior desafio na vida adulta com alotransplante de doador da mesma linhagem (11). Tanto Burnet pela formulação sobre a teoria da tolerância quanto Medawar por fornecer uma prova experimental de indução de tolerância, foram homenageados em 1960 com o Prêmio Nobel em

Medicina, colocando a tolerância como um mecanismo fundamental no correto funcionamento do sistema imune.

Não existe uma definição universalmente aceita de tolerância em transplantes. Esta deveria idealmente resultar em um estado no qual: a) o receptor não é capaz de montar uma resposta nociva contra o aloenxerto; b) a resposta do receptor a outro estímulo antigênico (por exemplo: patógenos) deve permanecer preservada; c) a estrutura normal e função do tecido do doador devem permanecer intactas; e d) o estado de tolerância deve ser duradouro, imperturbável, e não requer de um tratamento de imunossupressão em longo prazo para sua manutenção (12).

A tolerância é hoje considerada um mecanismo fisiológico, ativo e observado tanto a nível central (no timo) como a nível periférico. Desta forma, existe um processo de seleção negativa no timo que impede a maturação de precursores de linfócitos T que reagem com avidéz contra antígenos próprios durante seu desenvolvimento. Assim, os linfócitos T ativados pelos antígenos próprios apresentados pelas células do estroma da medula tímica morrem por apoptose ou tornam-se anérgicos, não sendo capazes de proliferar ante um segundo estímulo antigênico (13).

A utilização de alguma forma de imunossupressão é hoje, um requerimento utilizado para a indução de tolerância, em grande parte dos protocolos experimentais. Na maioria dos receptores, independente da estratégia de indução utilizada é possível encontrar células de origem hematopoiética denominadas leucócitos passageiros (“*passenger leukocytes*”) que migraram do enxerto (seja ele uma suspensão celular ou sólido) à periferia (14-16). Estas células, presentes em baixas quantidades, que podem ser detectadas tanto no sangue como nos tecidos do indivíduo transplantado, determinam um estado denominado microquimerismo. Este, assim denominado pelo grupo de Thomas Starzl, supõe que a presença dessas células tanto a nível central como periférico tenha um papel ativo na indução e manutenção da não responsividade e que estejam associadas como a aceitação do enxerto a longo prazo (14). Porém, embora a presença dessas células seja detectável na maioria dos casos, existem contradições na literatura quanto ao real significado dos leucócitos passageiros do

doador no hospedeiro (15). Um trabalho relativamente recente (17) demonstrou o efeito imunomodulador desses leucócitos em um modelo de transplante cardíaco em ratos, com indução de tolerância utilizando como droga imunossupressora a ciclosporina. Neste estudo, os autores utilizam um anticorpo monoclonal (anti-MHC de classe I RT7^a) contra um antígeno específico do doador, em dose única, que depleta especificamente uma população de leucócitos do doador CD45/RT7^a no dia do transplante (dia 0), e em um outro grupo, 18 dias após o transplante. Nos animais tratados no dia 0, foi observado um infiltrado de células mononucleares e linfócitos T, assim como um espessamento da luz capilar, evocando sinais de rejeição crônica após seguimento de 200 dias, ao contrário do observado nos animais que não receberam o tratamento com o anticorpo ou os que receberam no dia 18. O protocolo utilizado foi capaz de induzir aceitação do aloenxerto a longo prazo nos animais tratados com o anticorpo monoclonal no dia 18 após o transplante. Esses achados sugerem que, neste modelo, os leucócitos passageiros teriam um papel crítico e relevante na fase ativa da indução da prolongação do enxerto, e que sua depleção seria a causa da indução de eventos relacionados à rejeição crônica, como observado no grupo que recebeu o tratamento no dia 0.

Além do microquimerismo, que não requer necessariamente a utilização de condicionamento mieloablativo do receptor ou do enxerto, existe a nível central um segundo estado de indução de tolerância denominado macroquimerismo ou quimerismo alogênico misto (“*mixed allogeneic chimerism*”) definido pela coexistência de células da medula óssea do doador e receptor, no receptor (18, 19). O trabalho de Strober *et al.* em 1989 (20) foi um dos primeiros a demonstrar a aquisição de tolerância a alotransplante de rim a partir de doador cadavérico. Neste, três receptores submetidos ao processo de irradiação linfóide total (TLI) prévio ao transplante demonstraram hiporresponsividade doador-específica e função normal do enxerto após suspensão das drogas imunossupressoras durante um período de 24, 10 e 69 meses para cada receptor, respectivamente. Utilizando a mesma estratégia de ablação do sistema imune através de TLI, Sayegh *et al.* (21) relataram a indução de tolerância a transplante renal em dois pacientes que tinham recebido previamente um

transplante de medula óssea do mesmo doador do enxerto renal. Embora esses trabalhos demonstrem a indução de tolerância a nível central por deleção de células da linhagem hematopoiética, o requerimento do pré-condicionamento do paciente por estratégias mieloablativas permanece atualmente como tratamento utilizado somente no transplante de medula óssea. Esta estratégia está associada a uma maior taxa de morbidade e mortalidade, além de doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) (22), que leva à falha do enxerto.

Devido às limitações associadas ao processo de TLI, começam a surgir novas alternativas de indução de macroquimerismo a nível experimental. Um dos trabalhos realizado em camundongos (23), relatou o uso de um anticorpo monoclonal (anti-CD154), e da proteína de fusão CTLA4Ig (“*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4-Imunoglobulina*”), como estratégia empregada para enxertar células da medula óssea de um doador geneticamente diferente, sem tratamento prévio. Nove animais de 14 desenvolveram macroquimerismo, demonstrado pela presença de várias linhagens celulares do doador (LT CD4, CD8, LB) no receptor. Posteriormente, para determinar se o macroquimerismo era capaz de induzir tolerância, foi realizado um segundo transplante de pele 4 ou 13 semanas após o primeiro transplante. (Em modelos experimentais em camundongos, a pele é considerada dentre os tecidos mais difíceis de serem enxertados, e é utilizado como condição *sine qua non* para a definição de indução de tolerância doador-específica (12, 24). Os animais com macroquimerismo apresentaram função normal do enxerto até o dia 145, quando foram sacrificados. Da mesma forma, a tolerância foi avaliada *in vitro*, por ensaio de citotoxicidade e cultura mista de linfócitos. Não houve proliferação de linfócitos T CD4, nem resposta de linfócitos T citotóxicos no grupo experimental de animais que desenvolveram macroquimerismo. Portanto a estratégia empregada bloqueou seletivamente a ativação de sinais coestimulatórios, permitindo a indução de tolerância demonstrada pela aceitação de um segundo transplante de pele do mesmo doador. Este protocolo oferece vantagens que rapidamente poderiam ser utilizadas na clínica: a) o uso de substâncias que já estão sendo testadas em ensaios clínicos (anti-CD154 e CTLA4Ig); b) ausência de pré-condicionamento mieloablativo; c) estratégia de indução de tolerância mais

segura na hora do transplante; d) ausência de necessidade de identidade do H-2 entre doador-receptor.

Estes avanços no campo do transplante de medula óssea sugerem que a indução de tolerância a transplante de órgãos sólidos e enxertos celulares com macroquimerismo possa se tornar uma realidade clínica no futuro. Porém, cabe ressaltar que embora a condição de micro ou macroquimerismo possam ser consideradas condições necessárias, não são sinônimos de tolerância.

Apesar desses mecanismos, a seleção negativa não é capaz de eliminar todos os clones auto-reativos presentes no timo, e a indução de tolerância central nem sempre tem sucesso na deleção desses clones. Em uma segunda etapa, foram sugeridos vários mecanismos diferentes que operam para garantir a tolerância dos linfócitos T a nível periférico: anergia, regulação, diferença imune no paradigma Th1/Th2, ignorância (12).

A nível clínico, o alotransplante requer da administração diária de agentes imunossupressores não específicos para prevenir o processo de rejeição aguda ou crônica. Alguns destes como os inibidores da calcineurina, ciclosporina e tacrolimus, se unem a proteínas intracelulares e inibem a transcrição da IL-2, crítica na proliferação dos linfócitos T. O sirolimus bloqueia a transdução de sinais emitidos após a ativação do receptor da IL-2 (IL-2R) pela IL-2. Outros imunossupressores são os agentes anti-linfoproliferativos, azatioprina e micofenolato, análogos de purinas que inibem a proliferação celular, e os anticorpos monoclonais contra epitopos presentes nas células T que agem depletando o organismo das mesmas por certo período ou bloqueando sua ativação (25). Mas, apesar de terem melhorado a taxa de sobrevivência no primeiro ano pós-transplante tanto para o paciente como para o enxerto, existem alguns efeitos adversos relacionados ao seu uso. Primeiro, a imunossupressão com estas drogas é inespecífica. Os pacientes têm um maior risco de apresentar infecções causadas por microrganismos oportunistas, assim como desenvolver certas formas de câncer. Em segundo lugar, com o uso crônico das mesmas, efeitos tóxicos inevitavelmente ocorrem (26). Em terceiro lugar essas drogas, que suprimem o sistema imune contra o enxerto, também estariam suprimindo mecanismos reguladores

importantes na indução ou na manutenção do estado de tolerância. Como consequência, os pacientes devem continuar recebendo drogas imunossupressoras durante toda sua vida.

Constantemente, surgem artigos descrevendo novas estratégias imunomodulatórias que tentam mimetizar mecanismos fisiológicos de tolerância a antígenos próprios. Assim, a união do TCR com o complexo antígeno/MHC na APC, na ausência de co-estimulação pode resultar em anergia clonal, no qual as células T tornam-se parcialmente inativas, não proliferam, e são incapazes de secretar IL-2. Esta propriedade têm sido amplamente utilizada em vários modelos de transplante *in vivo*, tentando induzir tolerância pelo bloqueio dos sinais mediados pela união ao CD28. CD28, é expresso de forma constitutiva nos linfócitos T CD4, reconhece e une-se a membros da família B7, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) na superfície da APC ativando o linfócito. Porém, B7.1 e B7.2 também se unem a outra molécula denominada CTLA4, expressa somente em linfócitos T ativados e que emite um sinal inibitório no linfócito T, reduzindo a secreção de IL-2, e induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 (27). A co-estimulação parece ser um processo complexo, onde moléculas de superfície celular podem emitir sinais de ativação ou de inibição, mantendo assim a homeostase do sistema imune.

O papel central de vias co-estimulatórias na rejeição têm sido demonstrado por vários experimentos que objetivam a indução de tolerância. A administração de anticorpos monoclonais contra CD80 e CD86, que bloqueiam a via CD28:B7; tem demonstrado prolongar a sobrevida de enxerto cardíaco em ratos. Não responsividade imunológica doador-específica foi demonstrada; estes animais aceitaram enxerto cutâneo do doador, mas rejeitaram estes enxertos quando provenientes de animais controle (doador não relacionado geneticamente) (28). A administração conjunta do anticorpo anti-CD80 e ciclosporina também inibiu a rejeição, em modelo de transplante de pele em primatas não-humanos (29). Da mesma forma a administração de anticorpo monoclonal anti-CD4 juntamente com a proteína de fusão CTLA4Ig induziram tolerância em animais previamente sensibilizados (30). Além disso, o bloqueio adicional da via CD40-CD40L com anti-CD154 e anti-CD4 resultou na

diminuição de rejeição crônica em um modelo de transplante aórtico murino (31). A utilização do anticorpo humano hu5C8 contra CD40L, que apresenta reação cruzada contra CD40L de macaco, foi estendido a um modelo pré-clínico de primata não humano. Este tratamento, consistindo em várias doses de anticorpo, a partir do dia do transplante de rim até o quinto mês pós-transplante, resultou em ausência de rejeição em 9 macacos, mesmo na ausência de drogas imunossupressoras convencionais (32).

A regulação ativa mediada por linfócitos T, denominados de células T supressoras ou reguladoras, foi proposta como outro mecanismo de manutenção de tolerância periférica. Segundo Zhai *et al.* (33), existe forte evidência implicando um papel ativo destas células para a regulação imune em transplante e na modulação de respostas auto-imunes. Primeiro, a tolerância em roedores pode ser transferida a partir de linfócitos presentes em receptores tolerantes a receptores virgens de tratamento (34). Segundo, a manutenção do estado de tolerância requer da persistência do antígeno (13), e por último podem ser freqüentemente encontrados grandes quantidades de linfócitos nos enxertos de animais tolerantes (35).

O fenótipo das células reguladoras não é totalmente conhecido. Porém, linfócitos CD4⁺CD25⁺ parecem ser os responsáveis pelo processo de regulação. Em modelo experimental em camundongos, Annacker *et al.* (36) exploraram o mecanismo de regulação desses linfócitos. Neste estudo, animais atímicos reconstituídos com diferentes populações de linfócitos mostraram que aqueles reconstituídos com linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} permaneciam livres de doenças autoimunes e, na contagem celular, a população recuperada era praticamente a mesma à aquela que tinha sido injetada. O papel regulatório desses linfócitos T parece ser dependente da expressão de IL-10, já que camundongos deficientes em IL-10 não são protegidos da indução de doença inflamatória intestinal e a expansão de linfócitos T CD4⁺ ativados não é eficientemente regulada.

Células com fenótipo e características similares às isoladas em camundongos, foram obtidas a partir de sangue periférico, em humanos (37). O mecanismo envolvido na supressão mediada por células CD4⁺CD25⁺ reguladoras parece ser dependente do

contato célula-célula e na inibição da proliferação e secreção de citocinas de células CD4⁺CD25⁻ ativadas.

Já está claramente definida na literatura a existência de respostas funcionais polarizadas pelos linfócitos T auxiliares (Th) CD4 e T citotóxicos (Tc) CD8 que dependem das citocinas que estes produzem. Assim, existem duas populações principais Th, Th1 e Th2, originadas a partir de um único precursor Th0. As células Th1 produzem predominantemente IL-2 e INF- γ , e as segundas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Os mecanismos efetores dependentes de Th1, como hipersensibilidade do tipo tardia e atividade T citotóxica, parecem exercer um papel central na rejeição aguda ao aloenxerto. Por outro lado, a produção de citocinas com o perfil Th2 pode ser importante na indução e manutenção da tolerância (38).

A diferenciação de um tipo celular em outro depende da via de entrada do antígeno, da composição física, do tipo de adjuvante, da dose inoculada do antígeno, e da presença de IL-4 (estimula a polarização a Th2) ou IL-12 (estimula a polarização a Th1) no microambiente. A ligação dessas citocinas aos seus receptores respectivos resulta na fosforilação de tirosinas nas moléculas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STAT6 e STAT4, respectivamente).

Porém, diferentemente do que se acredita em relação a este paradigma, Zhou *et al.* (39) utilizaram como modelo experimental de transplante cardíaco heterotópico camundongos nocautes para STAT4 e STAT6 como receptores. Aqui foi demonstrado que, o tempo de sobrevida do enxerto nos camundongos nocautes para STAT4 e STAT6 foi comparável ao observado nos camundongos normais. Da mesma forma, a aceitação do enxerto pela administração de CTLA4-Ig nos camundongos nocautes para STAT4 também foi comparável ao grupo controle. Em contraposição, a indução de aceitação do enxerto a longo prazo, pela administração de CTLA4-Ig nos camundongos nocautes para STAT6, prolongou-se por menos tempo que no grupo controle. Esplenócitos desses animais com curto tempo de sobrevida do enxerto, transferidos a animais singênicos com transplante cardíaco prévio não permitiram aumentar o tempo de sobrevida do enxerto nos novos receptores. Portanto, diferentemente dos camundongos nocautes para STAT4, os eventos relacionados à

resposta de tipo Th2, são mediados em parte pela sinalização pelo STAT6 (presença de IL-4) seriam necessários para induzir tolerância.

O modelo mencionado acima, permite estudar o papel de linfócitos Th1 ou Th2 na indução de rejeição aguda ou de tolerância. Talvez, existam outras vias de sinalização que contribuam à geração de respostas tipo Th1, ao contrário da resposta observada por linfócitos Th2, a qual pareceu estar mais restrita à sinalização mediada por STAT6.

Finalmente, o trabalho descrito por Lakkis et al. (40), demonstra a necessidade de órgãos linfáticos secundários (baço, linfonodos, e tecidos linfóides associados às mucosas) para induzir tolerância a órgãos vascularizados, pelo mecanismo de ignorância imunológica. Neste trabalho, este mecanismo de ignorância foi demonstrado utilizando como receptores do transplante cardíaco, camundongos sem órgãos linfáticos secundários (baço, linfonodos, ou ambos). Após o transplante, os animais esplenectomizados sem linfonodos demonstraram ausência de rejeição do transplante, e ausência de aloanticorpos contra antígenos do doador. Para excluir a possibilidade de que a falha na indução de uma aloresposta immune nos animais esplenectomizados sem linfonodos seja produto de uma deficiência na ativação dos linfócitos T, estas células T foram transferidas a receptores do transplante cardíaco, deficientes em linfócitos T com linfonodos normais. Neste caso, foi observada uma forte rejeição, similar à observada nos animais que receberam linfócitos T de doadores esplenectomizados sem linfonodos, mas sem prévio transplante cardíaco. Esses achados sugeririam que os aloantígenos presentes na periferia que não têm contato com órgãos linfóides secundários, não induziriam rejeição ou tolerância, porém seriam ignorados devido à falta de apresentação antigênica.

1.2. TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica tem sido desenvolvida principalmente com o objetivo de curar tanto doenças hereditárias quanto adquiridas, através da adição de um novo gene, ou pela correção ou substituição de um gene defeituoso. Este tipo de estratégia que resulta na modificação do repertório genético tanto de células somáticas quanto germinativas

para propósitos terapêuticos, envolve a administração *in vivo* ou *ex vivo* de um ou mais genes e as seqüências que regulam sua expressão, utilizando um sistema gênico de administração apropriado.

A transferência gênica *in vivo* consiste na introdução de genes a células, no local onde elas se encontram no corpo. Por outro lado, a transferência gênica *ex vivo* envolve a transferência de genes a células viáveis, que tenham sido temporariamente removidas do paciente e que, após o tratamento das mesmas, sejam reimplantadas.

A terapia gênica em células germinativas envolve a transferência de genes a células haplóides. Devido ao fato de que, nesta estratégia, tanto os indivíduos tratados quanto a sua progênie apresentam os genes transferidos, a terapia gênica em células germinativas em transplante de órgãos somente está sendo utilizada em modelos experimentais envolvendo animais de laboratório. Nesse sentido, uma de suas aplicações em potencial está nos xenotransplantes. Estão sendo desenvolvidos animais transgênicos com o objetivo de eliminar a rejeição contra xeno-antígenos, ou pelo menos, diminuir a vigorosa resposta imune contra estes (41). A nível clínico o xenotransplante ainda não é possível. A principal barreira para o seu sucesso é imunológica. Entretanto, aspectos éticos deverão ser criteriosamente analisados antes de sua aplicação clínica.

A terapia gênica é uma alternativa atraente para a indução de tolerância imunológica, pelo seu potencial em administrar, ao receptor ou ao enxerto, genes que codifiquem moléculas com potencial imunomodulatório.

1.3. VETORES UTILIZADOS

Devido à resistência da maioria das células, em incorporar o ácido desoxirribonucléico (DNA) estranho que codifica para a proteína de interesse, a transferência gênica deve ser feita através de vetores (42). Estes, são veículos utilizados para a administração dos genes de interesse às células alvo, que irão expressar a proteína terapêutica codificada pelo gene recombinante. Um dos fatores mais importantes além do gene de interesse, é a escolha do vetor a ser utilizado, que pode determinar o sucesso do protocolo. Essa escolha vai depender de variáveis como:

a) o tempo no qual o transgene deve ser expresso, b) o tipo de célula alvo, c) o estado de divisão das células alvo, d) o tamanho do gene a ser administrado, e) a potencial indução de uma resposta imune não desejada, f) a via de administração do vetor, g) a facilidade de produção do vetor e h) questões relacionadas à segurança do vetor escolhido e à possível toxicidade da proteína recombinante (4, 43, 44).

Os vetores podem ser divididos em duas grandes categorias: virais e não-virais. Estes diferem principalmente no processo de empacotamento do material genético. Os vetores virais oferecem certas vantagens com respeito aos vetores não virais. A união específica a receptores de membrana na célula alvo, a entrada eficiente do material genético no núcleo da célula e a habilidade de evasão da degradação intercelular mediada pelas nucleases (enzimas que clivam os ácidos nucleicos) são exemplos das vantagens do emprego de vetores virais (4).

Os vírus utilizados como sistema de administração de genes exógenos são manipulados geneticamente de forma que certas regiões, que codificam para proteínas envolvidas na replicação viral, são deletadas por técnicas de biologia molecular. Esses genes ausentes no genoma dos vírus são incorporados no genoma de células específicas, denominadas células de empacotamento, que expressam essas proteínas de forma constitutiva. Quando as células de empacotamento são transduzidas (infectadas por vetores virais) com o vírus com defeito replicativo, este utiliza as proteínas sintetizadas pela célula, que lhe foram deletadas, para a sua replicação. Dessa forma, partículas virais com defeito replicativo são produzidas pela célula de empacotamento, liberadas ao meio de cultura, e então, purificadas a partir do sobrenadante. Retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, herpes simples, e vaccínia, com defeito replicativo são utilizados em protocolos de terapia gênica. As principais características destes vetores virais estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Principais características dos vetores virais utilizados em terapia gênica.

Nome	Genoma	Vantagens	Limitação
Retrovírus	ssRNA ^a	Alta taxa de transdução. Integração estável no genoma. Os linfócitos T CD4 podem ser células alvo.	As células devem estar em divisão ativa. Integração randômica no genoma. Risco de reversão.
Adenovírus	dsDNA ^b	Alta taxa de transdução. Infecta um amplo espectro de células, com ou sem divisão celular. Alto título de expressão. Não integra no genoma. Epissomal.	Expressão transitória em células em divisão. Imunogenicidade.
Vírus Adeno-associados	ssDNA ^c	Integração em sítio específico. Infecta um amplo espectro de células, com ou sem divisão celular.	Tamanho limitado do DNA recombinante a ser clonado. Requer a presença do Adenovírus para se replicar.
Herpes simples	dsDNA ^b	Neurotrópico. Alto título de expressão. Epissomal.	Citotoxicidade.
Vaccinia	dsDNA ^b	Alto título de expressão.	Imunogenicidade.

ssRNA^a, RNA de fita simples; dsDNA^b, DNA de dupla fita; ssDNA^c, DNA de fita simples. Adaptado de: (45, 46).

Os retrovírus pertencem à família Retroviridae. Dentro da mesma família encontram-se também os espumavírus, vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) e vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2). Os retrovírus têm sido escolhidos como vetores para a maioria dos protocolos que envolvem terapia gênica em ensaios clínicos (35,8 %) (www.wiley.co.uk). O material genético do vírus, um RNA, forma um complexo com duas proteínas virais, a integrase e a transcriptase reversa, recoberto por uma camada lipídica. Uma vez que o vírus une-se aos receptores celulares através da glicoproteína de superfície, gp 120, a nucleoproteína é injetada no citoplasma e rapidamente é sintetizado um DNA complementar (cDNA) ao seu ácido ribonucléico (RNA). Esse cDNA integra-se aleatoriamente no genoma da célula hospedeira. Essa inserção garante a expressão prolongada dos genes do retrovírus mas aumenta o risco de mutagênese por ativação de proto-oncogenes ou pela inativação de genes supressores de tumores (45). A maioria dos membros dos retrovírus não é capaz de

infectar células que não se encontrem em divisão ativa, já que precisam da desintegração da membrana nuclear para atingir o genoma do hospedeiro.

Os adenovirus são icosaédricos, com 70-100 nm de diâmetro, e apresentam uma estrutura protéica que envolve o material genético do vírus. O dsDNA deste vírus penetra no núcleo por um processo que envolve várias etapas: união do vírus a receptores extracelulares, endocitose, liberação da partícula viral ao citoplasma induzida pelo pH ácido dos lisossomos e transporte do material genético ao núcleo da célula hospedeira. O mecanismo do direcionamento do DNA ao núcleo celular ainda não foi esclarecido. Porém, parece envolver uma proteína viral responsável pelo direcionamento do DNA viral aos poros da membrana nuclear. Durante este trajeto a estrutura protéica viral, formada por nove proteínas, vai se debilitando até chegar ao núcleo da célula hospedeira (47).

Os vetores adenovirais apresentam alta eficiência de transferência *in vivo*, e infectam tanto células em divisão ativa, como células em repouso. Porém, a expressão de seus genes embora possa ser prolongada é transitória, já que os adenovirus não se integram no genoma. Um dos maiores obstáculos à sua utilização reside na forte resposta imune humoral que eles induzem contra componentes do capsídeo viral, o que diminui sua eficiência em indivíduos imunocompetentes diminuindo a possibilidade de sua re-utilização (47, 48).

Para minimizar a resposta imune induzida contra o vetor e aumentar a resposta contra o gene terapêutico em situações nas quais a terapia gênica é empregada como vacina gênica, algumas estratégias têm sido empregadas nesses vetores. Um trabalho descreve a construção de um adenovirus híbrido Av12LacZ, onde epitopos imunodominantes do capsídeo de um sorotipo específico (sorotipo 5, freqüentemente encontrado na população) foram removidos, e substituídos por peptídeos análogos de um adenovirus de outro sorotipo (sorotipo 12). Este vírus quimérico demonstrou ser eficiente na evasão do sistema imune em camundongos previamente imunizados com adenovirus do sorotipo 5 (49). Outro estudo recente relata a construção de um vetor denominado *helper dependent adenovirus*, no qual todas as seqüências codificantes foram removidas e substituídas pelo gene recombinante. Igualmente ao trabalho

anterior, foi observada ausência de imunidade humoral quando os animais foram imunizados com partículas virais do mesmo sorotipo. Contrariamente ao relatado na literatura, o transgene foi expresso por um longo período (257 dias) nos músculos de camundongos imunocompetentes (50). Portanto, esses trabalhos demonstram a utilização de adenovirus como vetor de administração de genes exógenos com a possibilidade de múltiplas administrações na ausência de imunidade contra o vetor.

Os vírus adeno-associados, são vírus de DNA, pequenos e não patogênicos, que necessitam de um vírus auxiliar como o adenovirus ou o herpesvirus para se replicar. Assim como os retrovirus, esses vírus também se integram no genoma. Porém, a limitada capacidade de incorporação de DNA estranho (até 5 kb) e a necessidade de um vírus auxiliar faz dos vírus adeno-associados os vetores menos utilizados (51).

Os vírus Herpes simples (HSV) são formados por 152 kb de dsDNA empacotados no capsídeo e envoltos por uma bicamada lipídica. Entre o capsídeo e a bicamada existe uma região denominada tegumento. A interação do vírus com receptores na membrana da célula alvo, induz à fusão de ambas camadas lipídicas e o capsídeo ingressa no citoplasma celular. Esses vírus têm tropismo por células do sistema nervoso e acredita-se que os microtúbulos (componentes protéicos encarregados do movimento das organelas no citoplasma) participem no processo de transporte dos capsídeos de HSV, ao longo dos axônios até o núcleo (52).

1.4. GENES DE INTERESSE EM TRANSPLANTE

O processo de ativação das células T CD4 ou linfócitos auxiliares é central e crucial para o início e posterior regulação da resposta imune adaptativa, consistindo em uma fase de início antígeno-específica mediada por linfócitos T e B, e uma fase efetora antígeno-inespecífica (mediada por macrófagos e reação de hipersensibilidade do tipo tardia). Existem ao menos três sinais independentes e críticos que permitem que uma célula T ou linfócito T virgem responda a um estímulo antigênico quando este é proveniente de uma célula apresentadora de antígeno (APC). O primeiro sinal é mediado pela interação entre o receptor das células T e o complexo MHC/antígeno. O sinal 2, ou sinal co-estimulador, envolve a interação entre moléculas de adesão das

superfícies de ambas células, formando pares receptor:ligante, incluindo: CD28-B7.1 (CD80), CD28-B7.2 (CD86), e CD40-CD40L (CD154), entre outras; e por último o sinal 3, que é determinado pelo fator de crescimento e diferenciação celular, interleucina-2 (IL-2) (53).

CTLA4, CD 152, é expresso em linfócitos T ativados, e se une a membros da família B7 (B7.1 e B7.2) com maior afinidade que a molécula CD28. Ao contrário do CD28, a ligação do CTLA-4 transduz um sinal inibitório às células T ativadas (54-56). O bloqueio da via de co-estimulação CD28/B7 já foi realizado pela administração da molécula de fusão CTLA4-Ig (57). Esta contém o domínio extracelular da proteína CTLA-4 unida aos domínios constantes das cadeias pesadas C_H2 e C_H3 da molécula IgG humana ou de camundongo, aumentando sua meia vida.

Liu *et al.* utilizaram um vetor de adenovirus com defeito replicativo para a administração *ex vivo* de CTLA4-Ig no pâncreas. Neste modelo, em ratos, o pâncreas do doador foi tratado por perfusão intra-arterial a 4 °C previamente ao transplante em receptor alogênico. Ao mesmo tempo foi co-transplantado um coração de um terceiro doador. A expressão do CTLA4-Ig foi demonstrada por transcrição reversa e PCR somente no pâncreas, e foi induzida tolerância doador específica nos 5 animais testados. Os corações de doadores controles foram rejeitados, enquanto que os pâncreas funcionaram normalmente pelo período de observação. Este trabalho demonstrou a eficácia da administração local do vetor viral por perfusão *ex vivo* e o efeito imunomodulador, causado pela produção da proteína no tecido transduzido (58). Por outro lado, quando o pâncreas foi irradiado previamente ao transplante, a indução de tolerância foi inibida. Esse resultado sugere um papel central às APCs do doador, pois sua eliminação por irradiação interferiu com o efeito imunomodulador da proteína CTLA4-Ig (59).

Outro trabalho, utilizando o mesmo modelo de transplante de pâncreas, comparou a via de administração, duração e expressão dos vetores virais adenovirus e virus adeno-associados que codificam para a mesma proteína repórter β-galactosidase (Ad-LacZ e AAV-LacZ, respectivamente). Os vírus foram administrados por via intravenosa no receptor, ou por perfusão intra-arterial *ex vivo* nos enxertos. Os

resultados demonstraram ausência de expressão da proteína, quando os vírus foram administrados por via sistêmica. Porém, na administração *ex vivo*, a expressão a partir do AAV-LacZ foi associado com ausência de inflamação e aumento da sobrevida dos enxertos (60).

A administração de Ad-CTLA4-Ig por perfusão também foi utilizada em modelo de transplante cardíaco, em ratos, para a transfecção eficiente em tecido miocárdico (61). Neste protocolo, uma única dose prolongou por mais de 100 dias a sobrevida do aloenxerto, porém a estratégia não permitiu a indução de tolerância imunológica. Talvez, a quantidade de proteína sintetizada pelas células transfectadas não tenha atingido o limiar necessário para a manutenção de um estado global de tolerância.

Por outro lado, o receptor também pode ser condicionado no momento do transplante. Assim, o trabalho de Echizenya *et al.* relata a administração de adenovirus que codifica para a proteína de fusão CTLA4-Ig por via intravenosa em ratos Lewis submetidos a transplante ortotópico de intestino delgado. Nesse caso, 50 % dos animais transplantados desenvolveram não responsividade doador específica e sobreviveram por mais de 100 dias. Embora o estudo tenha utilizado um baixo número de animais (6 no grupo experimental), novamente a transferência de CTLA4-Ig por terapia gênica com o vetor viral de adenovirus parece ser uma estratégia promissora na prevenção de rejeição, mesmo em um modelo que emprega enxertos muito imunogênicos, como o intestino delgado (62). Já em outro estudo, quando as partículas virais (1×10^8) foram administradas por via sistêmica no doador, 24 horas antes de ser realizado o transplante de fígado, como única forma de pré-tratamento, 75 % dos receptores aceitaram o transplante por mais de 300 dias. Este efeito mostrou ser dependente do título viral, já que quando a dose inoculada foi duplicada, 100 % dos animais apresentaram tolerância (63).

Outra forma de administração de moléculas com atividade imunomoduladora no enxerto pode ser atingida através do co-transplante de células modificadas geneticamente. Em um estudo, O'Rourke *et al.*, utilizaram o gene recombinante CTLA4-Ig para transfectar células dendríticas alogênicas e co-transplantá-las com

ilhotas de pâncreas. As células transfectadas aumentaram a sobrevivência das ilhotas de 11 dias a 17 dias (64). A curta sobrevivência do enxerto poderia ser a consequência de morte das células dendríticas, necessárias para a manutenção da anergia, mecanismo que requer a persistência do antígeno (13).

Recentemente, foi publicado um trabalho onde um vetor viral de adenovírus expressa uma construção diferente de CTLA4. Nesta, a porção de imunoglobulina (Ig) foi removida para desestabilizar o produto CTLA4 e promover a rápida degradação extra-hepática, evitando assim imunossupressão fora do enxerto, mas mantendo a atividade imunomoduladora no microambiente onde é sintetizada, ou seja no fígado. Este novo vetor expressou uma proteína capaz de diminuir a proliferação de células alogênicas em cultura. Quando foram implantadas células tumorais na pele dos ratos como controle do efeito imunossupressor sistêmico, a regressão do tumor induzido fora do fígado, demonstrou o efeito imunossupressor do novo vetor restrito ao fígado (65).

Também recentemente foi publicado o primeiro trabalho utilizando o DNA complementar (cDNA) de CD40 de camundongo ligado à porção Fc de IgG humana e inserido em um vetor de adenovírus. Uma única administração de AdCD40-IgG intravenosa prolongou indefinidamente o enxerto hepático ortotópico em ratos (66).

O sistema imune oferece a possibilidade de manter uma resposta imune protetora contra antígenos estranhos, potencialmente prejudiciais ao organismo, assim como também prevenir reações contra antígenos próprios. Em ambos aspectos da imunoregulação, o resultado depende da interação de moléculas coestimulatórias, citocinas e também da expressão de ligante Fas (Fas-L, CD95L) (67). A interação de Fas-L em APC com seu receptor de morte celular Fas (CD95) é um dos eventos iniciais que levam à morte celular programada ou apoptose. Portanto, a expressão de Fas-L por células manipuladas geneticamente pode criar “sítios privilegiados”, do ponto de vista imunológico, pela indução de apoptose nos linfócitos reativos.

Esta estratégia foi explorada pelo grupo de Zhang *et al.* (48). Nesse trabalho, o adenovírus foi utilizado como vetor viral para a administração de Fas-L às células apresentadoras de antígeno por terapia gênica *ex vivo*. A inoculação dessas APCs

manipuladas por via intravenosa demonstrou expressão prolongada, por mais de 50 dias, do gene repórter β -galactosidase, em comparação com o controle. Também foi demonstrada uma resposta celular citotóxica (IL-2 e IFN- γ) diminuída. Esta hiporesponsividade demonstrou ser específica para adenovírus, já que a resposta de linfócitos T contra o vírus murino de citomegalovírus permaneceu inalterada. Por tanto foi possível a indução de tolerância contra o vetor de adenovírus pela expressão da molécula Fas-L.

A construção de células dendríticas com atividade citotóxica (*killer dendritic cells*), capazes de induzir sinais apoptóticos também foi explorada pelo grupo de Matsue *et al.* (68). Aqui, essas células dendríticas, que expressavam CD95L demonstraram induzir um efeito supressor antígeno-específico nos linfócitos T, dos animais inoculados. Da mesma forma, quando essas células eram inoculadas após a sensibilização dos animais, as células induziram um estado de imunossupressão antígeno-específica. Embora a utilização de Fas-L pareça ser efetiva como inibidora de respostas a nível experimental, existem dados contraditórios quanto ao real papel de Fas-FasL na rejeição de aloenxertos e tolerância.

Em modelo experimental de transplante cardíaco heterotópico em ratos, o pré-tratamento com uma única dose de DST determinou a indução de tolerância. Nesse modelo, os animais tolerantes apresentaram uma expressão diminuída de CD95L e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) intra-enxerto, comparado com os animais controles (69). Já em humanos, os dados não parecem conclusivos, quanto ao papel da apoptose mediada por Fas-FasL na rejeição em pacientes com transplante cardíaco. Um estudo recente (70) sugere que a apoptose, determinada pela expressão aumentada de CD95L ou FasL em 66 % das biopsias com rejeição comparada com 40 % das biopsias sem rejeição, possa ser um dos mecanismos responsáveis no processo de rejeição nesse tipo de transplante clínico. Contrariamente, Porter *et al.* (71) utilizando biópsias de pacientes com transplante de rim, não acharam uma correlação entre a expressão de Fas e Fas-L e o papel da apoptose na rejeição aguda.

Os trabalhos descritos por Qin *et al.* demonstraram a atividade imunossupressora da interleucina IL-10 viral (vIL-10) e do fator de crescimento

tumoral- β (TGF- β). Nesses, foi utilizado um modelo murino de transplante cardíaco heterotópico e a administração intramuscular dos genes através de diferentes vetores: retrovírus, adenovírus, herpes simples e plasmídeos com diferentes promotores, como única forma de condicionamento. Embora todos os protocolos tenham demonstrado expressão dos genes *in vivo*, a sobrevida do enxerto foi maior, quando utilizada a administração do gene vIL-10 com um retrovírus, sob controle do promotor MuLV-LTR ($36,7 \pm 1,3$ dias). Também houve prologamento da sobrevida do enxerto quando foi empregado o plasmídeo que codificava para o TGF- β sob controle do plasmídeo viral de SV40 ($26,3 \pm 2,5$ dias). Apesar deste trabalho ter demonstrado a transferência de genes através de diferentes maneiras, e imunomodulação com dois genes diferentes vIL-10 e TGF- β , estes não foram expressos pelos mesmos sistemas, o que não permite fazer uma comparação afim de determinar qual entre os protocolos imunomoduladores pode produzir o melhor resultado (72, 73). Em uma abordagem diferente, o plasmídeo que codifica para vIL-10 (complexado com lipossomos) foi administrado por perfusão cardíaca *ex vivo*. Esses, são lipídeos com carga positiva cuja interação com o DNA facilita sua incorporação pelas células. Aqui, o complexo plasmídeo-polímero prolongou a sobrevida do enxerto. Neste trabalho, não foi observada uma resposta mediada por anticorpos neutralizantes nos animais que receberam esse tratamento, tampouco uma resposta celular doador específica (74). Outro estudo, no qual vIL-10 foi administrada em vetor de adenovírus, demonstrou o efeito imunomodulador de IL-10 que, além de aumentar a sobrevida do enxerto, inibiu resposta imune humoral contra o vetor quando comparada com a inoculação do vetor sem o gene da vIL-10 (75). A introdução de genes imunomoduladores no vetor adenoviral poderia ser outro exemplo de aperfeiçoamento para a utilização de adenovírus em terapia gênica.

O pré-tratamento com aloantígenos é outra estratégia utilizada há algum tempo para modular a resposta a um aloenxerto. Inicialmente, as transfusões de sangue foram a fonte mais comum de administração de aloantígenos do doador. Porém, esta contém risco potencial de infecção assim como de alosensibilização (24).

A rejeição pode ser induzida contra qualquer molécula de MHC que difira entre doador e receptor. No entanto, dentro de uma combinação doador-receptor

específica (por ex. em camundongos B.10 (H-2^b)-C3H (H-2^k)) há certas moléculas que estimulam uma resposta imune mais vigorosa, são imunodominantes. Se a tolerância for induzida contra estas moléculas, é possível que não seja necessária a indução de tolerância contra todas as moléculas de MHC que possam estar presentes no órgão doador (4). Uma das estratégias aplicadas inicialmente em camundongo, empregou o pré-condicionamento de receptores com células isogênicas transfectadas com genes do MHC do doador na ausência de outros aloantígenos (76). Neste trabalho foi demonstrado que existe uma imunodominância com respeito às moléculas MHC de classe I e classe II, sendo K^b mais tolerogênica que a molécula de classe II IA^b e de classe I, D^b. Entretanto, tolerância imunológica só foi atingida quando este pré-tratamento foi realizado no contexto de imunossupressão com anticorpo monoclonal anti-CD4 (77, 78).

Existe um considerável interesse na utilização de células da medula óssea para a administração de aloantígenos, pois estas têm a capacidade de auto-renovação, persistência no receptor, e podem se diferenciar em qualquer linhagem de origem hematopoiética (79). Nesse sentido, Hayashi *et al.*, demonstraram a indução de tolerância a enxertos de pele em camundongos. Os animais foram previamente tratados com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e irradiação como estratégia de imunossupressão, e receberam células da medula óssea transduzidas com retrovírus com genes do MHC de classe I K^b do doador. Como resultado deste pré-condicionamento, foi demonstrada a presença de macroquimerismo (coexistência de células hematopoiéticas do doador e receptor) por mais de 30 semanas, e aceitação do enxerto de pele em 6 dos 7 animais tratados (80). Outros trabalhos também têm registrado a transdução *ex vivo* de células da medula óssea com vetores retrovirais que codificam a mesma molécula MHC de classe I do doador. Em todos estes casos ficou demonstrada tolerância operacional em transplante cardíaco heterotópico, em camundongos (79, 81, 82). Apesar dos resultados, este tipo de terapia tem limitações principalmente no que se refere à necessidade de manipulação de células do receptor *in vitro*, com risco potencial de contaminação.

Vários trabalhos têm relatado a utilização do MHC de classe II para a indução de tolerância imunológica em transplantes. Nesse sentido, novamente os retrovírus foram escolhidos como vetores de expressão do MHC de classe II suíno, juntamente com um gene que codifica para a resistência ao antibiótico neomicina (83). Posteriormente, o mesmo grupo (84) utilizando o mesmo modelo pré-clínico em suínos, descreveu a indução de tolerância a um enxerto renal, empregando células da medula óssea transduzidas *ex vivo* com retrovírus recombinante. Dos 4 animais transplantados, um deles apresentava função e histologia renal normais, 2,5 anos depois do transplante. Apesar do reduzido número de animais, o estudo tem relevância pré-clínica, e demonstra a possibilidade de pré-condicionamento pela expressão do MHC de classe II em células de linhagem hematopoiética. Esse mesmo vetor foi utilizado para transduzir células de medula óssea de camundongos C57BL/10, que não expressam a cadeia α do MHC de classe II, IE. O produto gênico DRB de suíno foi expresso na superfície das células destes roedores formando heterodímeros com o IE- β endógeno. Aqui, a indução de tolerância resultou na deleção de linfócito T aloespecíficos (85). Outros trabalhos relatados por Shimada *et al.* (86, 87) têm demonstrado a construção de retrovírus que expressam as duas cadeias polipeptídicas α e β , que formam o MHC de classe II da glicoproteína DQ em uma única célula transduzida. Porém, até o momento, não foi demonstrado indução de tolerância com esta estratégia. Em outro trabalho, (88) também utilizando retrovírus como vetor de administração de genes, a expressão de DRB ou a proteína repórter GFP (*green fluorescent protein*) foram induzidas sob controle de um promotor induzível. A inibição da resposta de linfócitos T alogênicos ocorreu juntamente com a expressão da proteína. Esse fato demonstrou uma correlação entre os eventos, criando a possibilidade de manipulação temporal dos genes expressos. A expressão de DRB e administração de ciclosporina A em células somáticas como protocolo de indução permitiu a indução de tolerância imunológica (89).

Embora exista um considerável interesse na utilização de vetores virais para a terapia gênica pelo fato de serem altamente eficientes na administração dos genes de interesse, independentemente do tipo de vetor, limitações como quantidade

insuficiente de partículas virais produzidas, imunogenicidade e potencial replicação de vírus competentes no hospedeiro, têm levado à busca de vetores mais seguros. Considerando essas limitações, parece atraente a alternativa da utilização de vetores não virais na terapia gênica.

Estes não são imunogênicos e possuem baixas ou nenhuma toxicidade. Além disso, as vacinas de DNA nu (*naked DNA*), apresentam uma série de vantagens com relação às vacinas virais. Elas são de fácil produção, promovem uma expressão prolongada do antígeno que estimula o sistema imune e induzem respostas qualitativamente diferentes, permitem manipular a antigenicidade da proteína ao nível de cDNA e, portanto, a resposta imune (90). Dessa maneira, a inclusão de seqüências regulatórias ou moduladoras além dos genes terapêuticos, sem a necessidade de produção e purificação da proteína permitem direcionar a resposta. Adicionalmente, podem ser co-administradas no plasmídeo outras citocinas ou moléculas co-estimulatórias para que se possa manipular a resposta imune de forma específica (43, 44, 91-93).

Apesar de tais vantagens, existem duas importantes limitações quanto ao seu uso. A primeira inclui a baixa eficiência de transferência gênica comparada com vetores virais, por não utilizarem receptores celulares para sua incorporação na célula alvo, e a segunda refere-se à possível expressão transitória dos genes, visto que não se integram no genoma da célula alvo.

Diversos tipos de vetores virais têm sido propostos onde a maior variabilidade encontra-se na via de administração. Assim, as vacinas de DNA ou vacinas gênicas se restringem, na maioria das vezes, a moléculas de DNA de dupla fita, circulares, fechadas e denominadas de plasmídeos, que têm capacidade de replicação autônoma. Esses vetores, além de carregarem os genes terapêuticos, apresentam seqüências adicionais. Um vetor típico consiste de vários elementos genéticos necessários para auxiliar na expressão intracelular do gene estranho nele inserido. Estes elementos incluem: (a) promotor de transcrição, (b) um elemento indutor opcional para aumentar a expressão do gene, (c) um gene estranho que codifica um produto de interesse, (d) elementos para o processamento do RNA; principalmente um sinal de poliadenilação e

outro elemento opcional, o íntron. Frequentemente, um gene marcador que confere resistência a um antibiótico (por exemplo, neomicina fosforiltransferase, o qual confere resistência ao antibiótico geneticina (*Neo^R*)) está incluído para a detecção e seleção positiva das células eucariotas recombinantes ou transfectadas *in vitro*. Além disso, o plasmídeo contém uma origem de replicação bacteriana para permitir a produção de grandes quantidades de DNA, e um marcador de seleção de antibiótico para permitir a identificação e isolamento das células bacterianas transformadas com o gene de interesse (42, 92).

A administração do DNA nu foi primeiramente demonstrada pela injeção direta de uma solução salina contendo o plasmídeo em músculo esquelético de camundongo (94). O mecanismo pelo qual o plasmídeo passa do espaço extracelular às células que o expressam não é claro. Porém, acredita-se que este seja internalizado pelos miócitos, células multinucleadas com os núcleos geralmente em posição periférica próximos à membrana plasmática, e também por APCs profissionais, como as células dendríticas. Embora ocorra a transfecção direta das APCs profissionais, a resposta imune é majoritariamente dependente da expressão antigênica em células não linfóides e da transferência às APCs (95). Entre outras vantagens, o músculo esquelético é de fácil acesso e ricamente vascularizado, permitindo a rápida liberação da proteína recombinante à circulação, a administração do gene pode ser repetida várias vezes e as proteínas são produzidas por longos períodos, que variam de semanas até meses (96).

Alternativamente a este método mais simples, está o bombardeamento de partículas ou biobalística, método físico pelo qual, partículas de ouro recobertas com o DNA, são aceleradas por uma descarga de alta voltagem que impõe alta velocidade às partículas, permitindo que penetrem na pele, *in vivo*, ou em monocamadas celulares, *in vitro* ou *in vivo*, ou ainda *ex vivo*. Outros métodos incluem a interação do DNA com lipossomos catiônicos, denominados lipoplex, ou com polímeros com carga positiva, denominados poliplex, ou uma mistura de ambos, denominados lipopoliplex (97). Os três métodos utilizam o mesmo princípio de interação de cargas negativas do DNA, com cargas positivas para a formação do complexo. Todos os sistemas utilizados

apresentam vantagens e desvantagens e não existe um sistema perfeito de transferência gênica.

Em transplante de órgãos, a experiência com modelos animais demonstra que a transferência gênica pode ser realizada tanto no órgão do doador antes, durante, ou várias horas depois do procedimento de remoção do órgão, assim como no receptor. Desta maneira, o vetor pode atingir o órgão do doador por injeção intravascular, perfusão *ex vivo*, ou diretamente no parênquima, embora este último procedimento tenha o risco de danificar o órgão transplantado (98).

Diferentemente das vacinas convencionais utilizadas como forma de tratamento profilático, as vacinas de DNA empregadas nos modelos experimentais em transplante podem ser “vacinas terapêuticas”. A terapia gênica em transplante de órgãos surge como uma estratégia para modificar o microambiente no qual acontece o processo de rejeição, aumentando a sobrevivência do órgão transplantado, assim como também do receptor objetivando evitar o uso de drogas imunossupressoras inespecíficas.

1.5. VP22: FERRAMENTA ALTERNATIVA COMO VIA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS EXÓGENAS

Um problema inerente à terapia gênica reside na dificuldade de administrar-se o agente terapêutico a um número suficientemente grande de células e em quantidades apropriadas de forma a induzir uma resposta adequada. A inoculação intramuscular do DNA nu, resulta na transfecção de 1-5 % dos miócitos (96). Este baixo número tem induzido à busca de alternativas para aumentar a capacidade das células de incorporação da molécula recombinante.

O vírus Herpes Simples do tipo-1 codifica durante a infecção para uma proteína estrutural de 32 kDa, 301 aminoácidos, básica, e altamente fosforilada, (99) que exibe como característica uma propriedade diferencial de transporte intercelular. (100) Esta proteína VP22 se localiza em uma região pouco conhecida do vírus, exterior ao capsídeo e rodeada pela bicamada lipídica, denominada tegumento. Durante uma infecção natural por Herpes simples, ou mediante a administração de

uma vacina de DNA que contém o cDNA para esta proteína, VP22 é sintetizada no citoplasma da célula infectada ou transduzida. Através de um mecanismo que parece utilizar filamentos de actina, esta molécula se espalha às células da vizinhança onde, mediante reorganização dos microtúbulos, se acumula nos núcleos celulares (100-103). A proteína apresenta dois domínios, um amino terminal, responsável pela união ao DNA, e outro carboxi terminal responsável pelo processo de translocação. Este processo não é dependente do tipo celular, pois já foram realizados em ensaios *in vitro* em 15 linhagens celulares diferentes (104). Igualmente, este não depende do estado de diferenciação das células, já que experimentos *in vitro* em co-cultura demonstraram que é possível a translocação da proteína quimérica VP22-proteína verde fluorescente (GFP) às células musculares terminalmente diferenciadas (105). Esta característica de translocação faz de VP22 um veículo potencial como carregador de outras proteínas, de interesse em terapia gênica a outras células que não foram atingidas pelo DNA recombinante.

A maioria dos estudos realizados com a VP22 fusiona a sua porção amino ou carboxi terminal diversas proteínas para analisar o mecanismo de translocação da VP22; entre elas a GFP, β -galactosidase ou o gene da proteína p53 (99-101, 106-108). Neste último, as proteínas híbridas VP22-p53 foram capazes de restaurar a ausência de p53 na linhagem celular humana de osteosarcoma SAOS-2 e induzir apoptose na monocamada celular, como demonstrado pela contagem do DNA marcado com iodeto de propídio (109).

VP22 também foi utilizada para produzir outra proteína quimérica, VP22-Timidina quinase (VP22-TK). *In vitro*, VP22 promoveu a disseminação da enzima TK a praticamente todas as células presentes na monocamada celular, resultando na morte das mesmas na presença de uma concentração menor de ganciclovir (GCV), quando comparado com a dos experimentos controles. Novamente, VP22 é capaz de aumentar a quantidade de células que apresentam a enzima TK e amplificar dessa forma a estratégia de terapia gênica suicida na combinação de TK-GCV (110). Outro estudo, (111) relatou a utilização do extremo carboxi responsável pelo processo de translocação, resíduos aminoacídicos 159-301 VP22.C1, como administrador de

oligonucleotídeos (ODN). Neste trabalho, os autores demonstraram a união de VP22.C1 a diferentes ODN. A formação desse complexo resultou ser seqüência inespecífica e foi possível demonstrar a localização do complexo em monocamadas celulares *in vitro* pela união de um fluorocromo ao ODN ou a VP22.C1. Porém, após a iluminação com luz epifluorescente, o complexo foi clivado e migrou ao núcleo celular. A união de VP22.C1 a um ODN anti-sentido (*anti-sense*) com a seqüência complementar ao gene de ativação mitogênica *c-raf*, demonstrou a inibição do crescimento celular, em presença de luz. Portanto, embora existam vários mecanismos que não sejam explicados, como a interação de VP22.C1 com a molécula carregada, a incorporação nas células ou o mecanismo de ação da luz, este novo peptídeo VP22.C1 denominado Vectossoma (VP22 *effected complex transport bodies*) além de carregar proteínas, pode carregar pequenos oligonucleotídeos capazes de exercer um controle na regulação celular a nível gênico.

Recentemente, Wills *et al.* demonstraram a atividade anti-tumoral de uma vacina de DNA de adenovírus que expressa a proteína de fusão VP22-p53. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, o aumento da distribuição da proteína terapêutica p53 *in vivo* e o aumento de apoptose quando comparada com o vetor controle que expressa somente p53, outorgando à proteína VP22 um papel fundamental no processo de administração de proteínas exógenas com atividade endógena (112).

Com base nos conhecimentos acima mencionados e objetivando a construção de uma ferramenta molecular para a indução de tolerância imunológica em transplantes de órgãos, o presente estudo foi realizado.

Para tal, idealizamos o aproveitamento da imunodominância da molécula de classe I do MHC, K^b, associada à propriedade de tráfego intercelular da molécula VP22.

2. OBJETIVOS

1. Construir duas ferramentas moleculares pVP22::K^b e pCIneo::K^b para futura utilização em terapia gênica.

2. Demonstrar a expressão da proteína K^b em células eucarióticas transfectadas com os vetores recombinantes pVP22::K^b e pCIneo::K^b.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO INSERTO K^b

O inserto K^b contendo toda a seqüência do gene que codifica a molécula K^b do MHC de classe I foi obtido a partir de duas formas: de uma construção no plasmídeo pBluescriptIISK (+/-) (Figura 1) gentilmente cedido pela Doutora Kathryn Wood (Universidade de Oxford, Inglaterra), e a partir de uma extração de RNA total do baço de um camundongo C57BL/6, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) (seção 3.2.1.).

Portanto, a clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His (Invitrogen[®]), foi realizada através de duas estratégias diferentes, dependendo da fonte inicial do K^b .

3.1.1. Primeira estratégia de clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His

Para a clonagem do inserto K^b (acesso ao banco de dados da seqüência nucleotídica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, U47328, Figura 2) no plasmídeo pVP22/myc-His (Invitrogen[®]), foi necessário empregar uma estratégia utilizando um plasmídeo intermediário, pois não havia alternativa de clonagem direta que deixasse os genes VP22 e K^b na mesma pauta de leitura. Para tanto, foi utilizado o plasmídeo de expressão em células eucariotas pCIneo (Promega[®]) amplamente encontrado na literatura (113). O plasmídeo pBluescriptIISK:: K^b codifica para uma seqüência levemente maior (1.628 pb) à original mostrada na figura 2 (1.564 pb), que contém um sítio 5' à seqüência do K^b , (bases adicionais: 5' –GAA TTC CAT CGC CGA CAG GTG CG-3') e outro 3' (com 31 pb adicionais), com os sítios de restrição para a enzima *EcoR* I, com a qual foi clonado.

Assim, 5 μ l do plasmídeo pBluescriptIISK (+/-) que possuía o inserto K^b de 1.628 pb previamente clonado no sítio de restrição da enzima *EcoR* I, denominado pBluescriptIISK:: K^b foi clivado com a mesma enzima de restrição (10 U/ μ l) em 10 μ l

de volume final. A reação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler-200, MJ Research) durante 4 h a 37 °C.

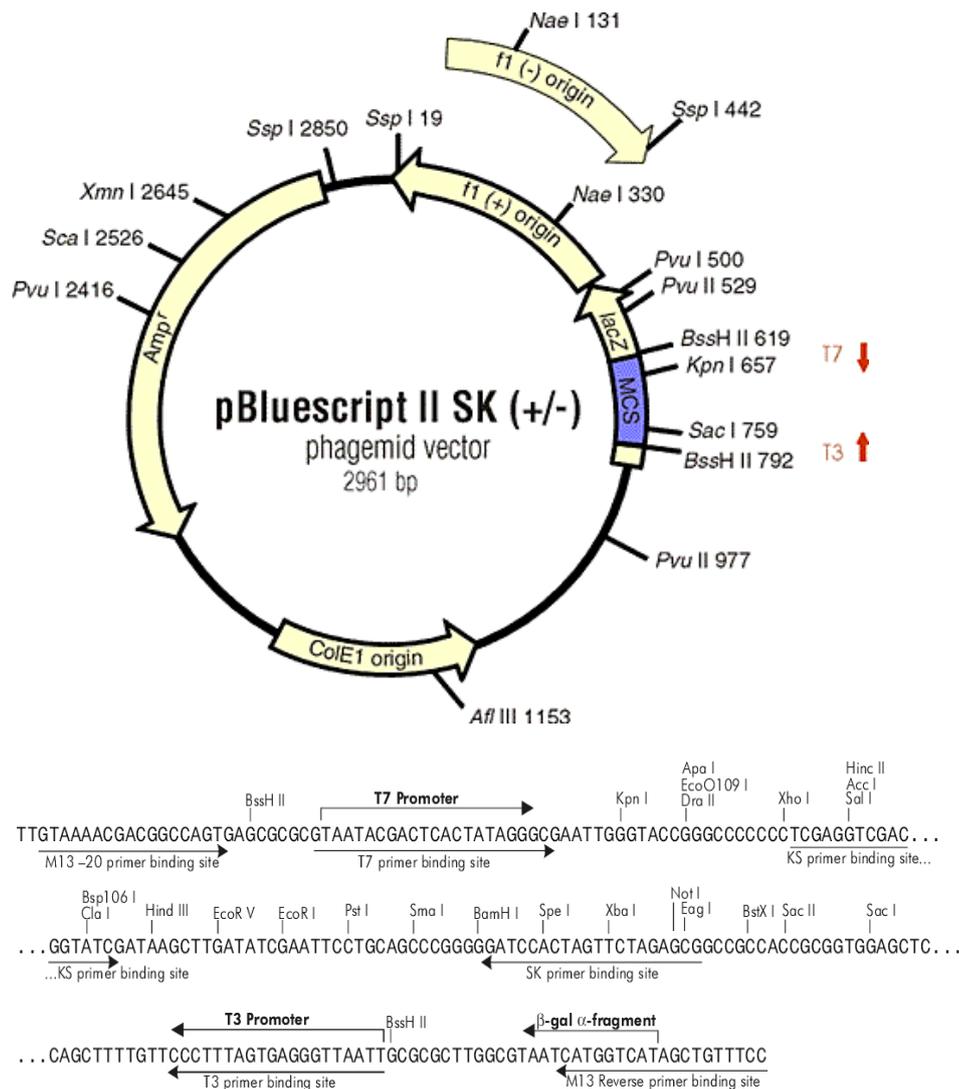


Figura 1. Representação esquemática do plasmídeo pBluescript II SK (+/-) (Stratagene) e seqüência do sítio de múltipla clonagem. Em destaque na figura estão os principais elementos do plasmídeo. Gene de resistência a ampicilina, origem de replicação ColE1, a qual permite a replicação em alto número de cópias. Na parte inferior da figura está a região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição, assim como o sítio e a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores M13 direto (-20).

```

1  atgggtaccgt gcacgctgct cctgctgctg gcggccgccc tggctccgac tcagaccg
61 gcgggccac actcgtgag gtatttcgtc accgccgtgt cccggcccgg cctcggggag
121 ccccggtaca tggaggtcgg ctacgtggac gacacggagt tcgtgcgctt cgacagcgac
181 gcgggagaatc cgagatatga gccgcgggcg cggtggtatgg agcaggaggg gcccgagtat
241 tgggagcggg agacacagaa agccaagggc aatgagcaga gtttccgagt ggacctgagg
301 accctgctcg gctactacaa ccagagcaag ggcggctctc acactatca ggtgatctct
361 ggctgtgaag tggggtccga cgggcgactc ctcccggggt accagcagta cgctacgac
421 ggctgcgatt acatcgccct gaacgaagac ctgaaaacgt ggacggcggc ggacatggcg
481 gcgctgatca ccaaacacaa gtgggagcag gctgggtgaag cagagagact cagggcctac
541 ctggagggca cgtgcgtgga gtggctccgc agatacctga agaacgggaa cgcgacgctg
601 ctgcgcacag attccccaaa ggcccatgtg acccatcaca gcagacctga agataaagtc
661 accctgaggt gctgggccct gggcttctac cctgctgaca tcaccctgac ctggcagttg
721 aatggggagg agctgatcca ggacatggag ctgtgtggaga ccaggcctgc aggggatgga
781 accttccaga agtgggcatc tgtgggtggtg cctcttggga aggagcagta ttacacatgc
841 catgtgtacc atcaggggct gcctgagccc ctaccctga gatgggagcc tcctccatcc
901 actgtctcca acatggcgac cgttgctggt ctggtgtgcc ttggagctgc aatagtcact
961 ggagctgtgg tggcttttgt gatgaagatg agaaggagaa acacaggtgg aaaaggaggg
1021 gactatgctc tggctccagg ctcccagacc tctgatctgt ctctcccaga ttgtaaagtg
1081 atggttcatg accctcattc tctagcgtga agacagctgc ctggagtgga cttggtgaca
1141 gacaatgtct tctcatatct cctgtgacat ccagagccct cagttctctt tagtcaagtg
1201 tctgatgttc cctgtgagcc tatggactca atgtgaagaa ctgtggagcc cagtccacc
1261 ctctacacca ggaccctgtc cctgcactgc tctgtcttcc cttccacagc caaccttgct
1321 ggttcagcca aacactgagg gacatctgta gcctgtcagc tccatgctac cctgacctgc
1381 aactcctcac ttccacactg agaataataa tttgaatgta accttgattg ttatcatctt
1441 gacctagggc tgatttcttg ttaatttcat ggattgagaa tgcttagagg ttttgtttgt
1501 ttgtttgatt gatttgtttt tttgaagaaa taaatgatag atgaataaac ttccagaatc
1561 tgca

```

Figura 2. Sequência do gene H-2K^b que codifica para a cadeia pesada α do MHC de classe I de camundongo. Em negrito, codons de início (atg) e de término da tradução (uga).

3.1.2. Análise e documentação dos géis de agarose

Todas as análises, tanto do DNA quanto do RNA foram realizadas em gel de agarose (1,5 %) contendo Brometo de Etídio (EtBr, 0,4 ng/ml). O material foi submetido a eletroforese horizontal em tampão Tris/Ácido Acético/EDTA (TAE) e visualizado com iluminação ultravioleta (UV) a 302 nm (3UV-Transilluminator, Upland). Os géis foram documentados por fotografia instantânea *Polaroid*.

3.1.3. Extração do inserto K^b do gel de agarose

A reação de digestão do plasmídeo pBluescriptIISK::**K^b** clivado com a enzima de restrição *EcoR* I foi analisada em gel de agarose ao 1,5 %, corado com brometo de

etídeo (EtBr) e visualizada sob luz ultravioleta como descrito na seção anterior. O fragmento de DNA correspondente ao K^b de 1.628 pb, foi cortado do gel e o DNA extraído com o kit *Concert Gel Extraction* (Gibco) que utiliza uma solução de perclorato de sódio para dissolver o gel de agarose, e uma resina de sílica para capturar e purificar o fragmento de DNA. A agarose e o tampão de eletroforese foram removidos com os tampões com álcool, e o DNA para clonagem foi eluído em 20 μ l de Tris-EDTA (TE) pH 8,0, segundo indicações do fabricante (114).

3.1.4. Clonagem do inserto K^b no plasmídeo pCIneo

Uma vez obtido o inserto K^b , o vetor no qual foi clonado foi preparado. Para isso, 5 μ l do plasmídeo pCIneo (Figura 3) foram digeridos com 10 U de *EcoR* I (10 U/ μ l, Gibco), e 1,0 μ l do tampão 3 10x (Gibco) em um volume final de 10 μ l por 4 h a 37 °C. Após este período, o plasmídeo foi defosforilado com 1 μ l da enzima fosfatase alcalina CIAP (25 U/ μ l, Gibco) durante 5 min a 37 °C, seguido da inativação da mesma pela adição de 0,5 μ l de EDTA (pH 8,0), e incubado por 15 min a 65 °C. O DNA foi precipitado com 0,2:1 de acetato de potássio (2,5 M) e 2,2:1 de etanol absoluto, pela incubação em nitrogênio líquido (N_2) durante 5 segundos (s) seguido da centrifugação em microcentrífuga (5414C, Eppendorf) a 14.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi aspirado e o tubo incubado de forma invertida a temperatura ambiente durante 20 min aproximadamente. Uma vez seco, o DNA foi solubilizado com 5 μ l de água MilliQ (H_2O MQ).

As clonagens foram feitas em um volume final de 15 μ l com 0,5 μ l do plasmídeo linearizado e defosforilado, 5 μ l do inserto, 3 μ l do tampão da enzima (5x, Gibco), e 1 μ l da enzima T4 DNA Ligase (1U/ μ l, Gibco). As misturas foram incubadas por 18 horas a 22 °C. Foram incluídos dois controles negativos, nos quais o inserto ou o plasmídeo não foram adicionados à reação, e o volume final de 15 μ l foi completado com H_2O MQ.

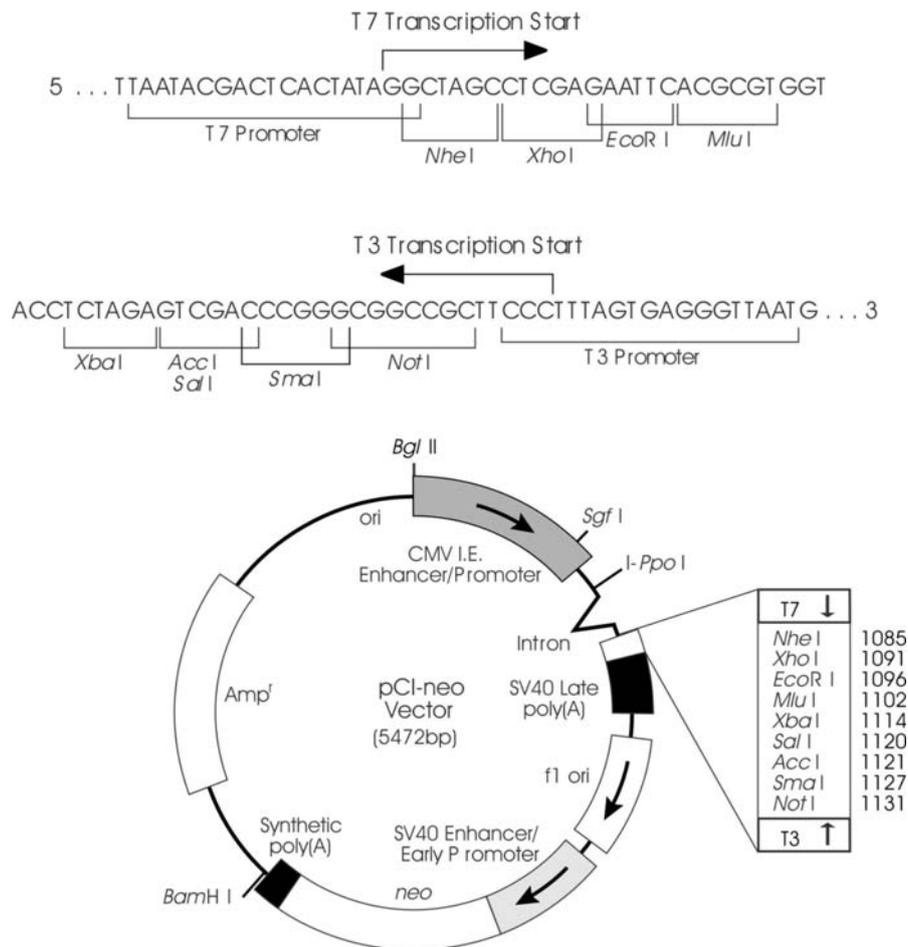


Figura 3. Representação esquemática do plasmídeo pCIneo® (Promega) e seqüência do sítio de múltipla clonagem. Em destaque na figura estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência para os antibióticos ampicilina e neomicina; a origem de replicação derivada dos vírus f1 e SV40; o promotor do citomegalovírus P_{CMV}, que permite a expressão dos genes recombinantes em células eucarióticas; e SV40 pA, a seqüência que adiciona a cauda poliA. Na parte superior da figura está a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição.

3.1.5. Preparação de células eletrocompetentes para a transformação com os plasmídeos

Uma vez realizada a clonagem, os produtos obtidos, ou seja os plasmídeos recombinantes, devem ser amplificados para poder serem analisados. Para isso, é necessária a utilização de células competentes, capazes de incorporar o DNA recombinante. Assim, para todas as transformações foi utilizada a cepa de *E. coli* Top10 (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG).

E. coli Top10 eletrocompetentes, foram preparadas pela inoculação de uma colônia isolada em 10 ml de meio líquido SB-Tetraciclina (50 μ g/ml) e incubada em banho de água (Microprocessor Shaker Bath, LabLine) a 37 °C com agitação a 250 revoluções por minuto (rpm) durante 18 h. Parte desta cultura (1,25 ml), foi inoculada em meio líquido SB (250 ml) contendo 5 ml de glicose 20 % e 2,5 ml de MgCl₂ 2M. A cultura foi incubada a 37 °C com agitação a 250 rpm. O crescimento da mesma foi monitorado em espectrofotômetro até densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) = 0,7 - 0,8 (Genesys 2, Spectronic, USA). Logo após, a cultura foi resfriada em banho de gelo durante 15 min e centrifugada (Sorvall RC 5C Plus) a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com glicerol 10 % reduzindo o volume do mesmo em cada lavagem (250 ml, 125 ml, e 62,5 ml, respectivamente). O precipitado foi novamente solubilizado com 1,5 ml de glicerol 10 % (115). As células foram estocadas em alíquotas de 100 μ l e congeladas a -80 °C. A eficiência da transformação foi testada utilizando um plasmídeo controle pUC18 (10 ng/ μ l, Invitrogen).

3.1.6. Transformação de *E. coli* Top10 com pCIneo:: K^b por choque elétrico

Para cada transformação foram utilizadas 100 μ l de células eletrocompetentes *E. coli* Top10 previamente armazenadas a -80 °C. As células foram descongeladas em banho de gelo durante 30 min e uma alíquota de cada ligação pCIneo:: K^b (5 μ l) foi adicionada ao tubo com as células eletrocompetentes. A mistura permaneceu no gelo por 30 min e após esse período foi transferida a uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm

(Bio RAD). A eletroporação (Gene Pulser System, Bio RAD) foi realizada nas seguintes condições: 2,5 kV, 200 Ω e 25 μ F. As células foram suplementadas com 2,0 ml de meio líquido LB, e agitadas a 250 rpm durante 1 h de incubação a 37 °C. Após uma hora, 10 μ l e 100 μ l da cultura foram semeados em meio LB sólido (agar 1,5 %) suplementado com o antibiótico carbenicilina (50 μ g/ml). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

3.1.7. Análise dos clones recombinantes Top10/pCIneo::K^b

Para determinar a presença do plasmídeo recombinante pCIneo::K^b nas células transformadas, seis colônias isoladas da transformação Top10/pCIneo::K^b foram repicadas em 4 ml de LB-Carbenicilina (50 μ g/ml) e crescidas durante 18 h a 37 °C em banho com agitação para a purificação do plasmídeo. Três ml de cada cultura foram centrifugados a 6.000 rpm durante 5 min e solubilizados com 100 μ l de tampão TE pH 8,0. O mesmo volume de NaOH-SDS e 125 μ l de uma solução de acetato de sódio 3 M foram adicionados, seguidos de uma centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante passado por uma matriz de fibra de sílica que une o DNA em presença de um sal caotrópico. A matriz foi lavada duas vezes com um tampão de lavagem e o DNA plasmidial foi eluído com 35 μ l de H₂O MQ, segundo indicações do fabricante (116).

Para a determinação da orientação do inserto, 2 μ l de cada extração plasmidial foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *Not* I (10 U/ μ l, Gibco), e 1 μ l do tampão de reação 4 (10x, Gibco) em 10 μ l de volume total de reação, e incubados a 37 °C durante 4 h em termociclador.

3.1.8. Clonagem do inserto K^b no plasmídeo pVP22/myc-His

Um dos clones TOP10/pCIneo::K^b obtidos, que continha o inserto K^b na correta orientação 5' \rightarrow 3' foi utilizado na próxima subclonagem no plasmídeo pVP22/myc-His (Figura 4) (117). Novamente, 10 μ l do plasmídeo pCIneo::K^b foram clivados com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Xba* I. A digestão foi analisada em gel de agarose ao 1,5 % e a banda de 1.651 pb correspondente a inserto K^b foi purificada como descrito

na seção 3.1.3.. O plasmídeo pVP22/*myc*-His (10 µl) foi digerido com 10 U de *Xba* I (10 U/µl, Gibco), e 1,5 µl do tampão 2 10x (Gibco) em um volume final de 15 µl e incubado durante 4 h a 37 °C no termociclador. Após o término da mesma, foi defosforilado com 1 µl da enzima fosfatase alcalina CIAP (25 U/µl, Gibco) durante 5 min a 37 °C, seguido da inativação da enzima pela adição de 0,5 µl de EDTA pH 8,0, e incubação durante 15 min a 65 °C no termociclador. A amostra foi precipitada com 0,2:1 de acetato de potássio (2,5 M) e 2,2:1 de etanol absoluto, pela incubação em N₂ líquido durante 5 s, seguida da centrifugação em microcentrífuga a 14.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi aspirado e o tubo incubado de forma invertida a temperatura ambiente durante 20 min aproximadamente. Uma vez seco, o DNA foi solubilizado com 5 µl de água MilliQ (H₂O MQ).

A reações de clonagem e transformação foram realizadas como detalhado nas seções 3.1.4 e 3.1.6. respectivamente.

VP22 ORF
 1769 CGA GCC CCA GCC CGC TCC GCT TCT CGC CCC AGA CGG CCC GTC GAG GGT ACC GAG CTC GGA TCC ACT
 Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro Val Glu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr
 1835 AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT ATC CAG CAC AGT GGC GGC CGC TCG AGT CTA GAG GGC CCG
 Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro
 1901 CGG TTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT ATG CAT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC
 Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His
 1967 CAT TGA GTTTAAAC CCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCTCCCC
 His ***
 pcDNA3.1/BGH Reverse priming site
 BGH polyadenylation signal
 2041 CGTGCCTTCC TTGACCTCG AAGGTGCCAC TCCACTGTCT CTTTCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGCTGA
 2121 GTAGGTGTC TTTATTTCTG GGGGGTGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT

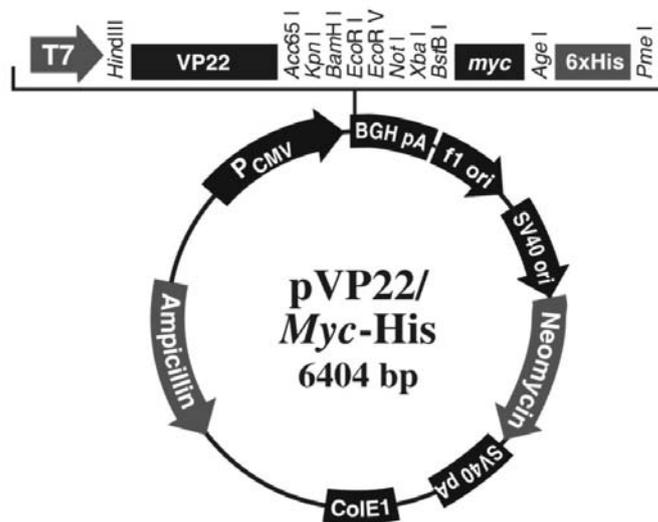


Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pVP22/Myc-His[®] (Invitrogen) e seqüência do sítio de múltipla clonagem. Em destaque na figura estão os principais elementos do plasmídeo: os genes de resistência para os antibióticos ampicilina e neomicina; a origem de replicação derivada do vírus f1 e SV40; o promotor de citomegalovirus P_{CMV}, que permite a expressão dos genes recombinantes em células eucarióticas; e SV40 pA, a seqüência que adiciona a cauda poliA. Na parte superior da figura está descrita a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição, assim como o fim do gene que codifica para a proteína VP22.

3.1.9. Análise dos clones recombinantes Top10/pVP22::K^b

Para determinar a presença do plasmídeo recombinante pVP22::K^b nas células Top10 transformadas, onze colônias isoladas foram repicadas em 4 ml de LB-Carbenicilina (50 µg/ml) e cultivadas durante 18 h a 37 °C em banho com agitação para a purificação do plasmídeo segundo descrito na seção 3.1.7.. Uma alíquota (1µl)

de DNA plasmidial de cada amostra foi analisada em gel de agarose (1,5 %) corado com EtBr e 2 µl foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *Kpn* I (10 U/µl, Gibco), e 1 µl do tampão de reação 4 (10x, Gibco) em 10 µl de volume total de reação, incubados a 37 °C durante 4 h em termociclador para a determinação da orientação do inserto.

A ausência de clones com a orientação correta do inserto 5'→ 3' (cuja probabilidade de inserção seria de 50 % em cada orientação) nos fez pensar em uma nova estratégia para a clonagem do gene *K^b* no plasmídeo pVP22/myc-His.

3.2. SEGUNDA ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DO INSERTO *K^b* NO PLASMÍDEO pVP22/myc-His

3.2.1. Extração de RNA total de camundongo C57BL/6

Como segunda estratégia para a obtenção do DNA que codifica para a proteína *K^b*, foi realizada uma extração de RNA total. Foi utilizado um camundongo macho da linhagem C57BL/6 (haplótipo H-2^b) de mais de 8 semanas de vida da Fundação Estadual de Produção em Pesquisa Animal (FEPPS) do Rio Grande do Sul. O animal foi colocado em uma câmara saturada de CO₂ durante o tempo necessário até a parada respiratória e cardíaca. Imediatamente após, o baço foi excisado e homogenizado em homogenizador de vidro com 1 ml de TRIZOL Reagent (Gibco). Após uma centrifugação por 10 min a 12.000 rpm em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5417R) a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e 200 µl de clorofórmio foram adicionados. A solução foi homogenizada por agitação mecânica e novamente centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C por 15 min. Essa centrifugação separa a solução em três fases, uma inferior orgânica, uma intermediária, e por último uma superior aquosa onde se encontra o RNA. Esta fase foi transferida para outro tubo e adicionados 500 µl de álcool isopropílico e incubados durante 10 min a temperatura ambiente. Passado esse período de tempo, a solução foi centrifugada novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol ao 75 %, e centrifugado a 8.400 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e o tubo incubado de forma

invertida a temperatura ambiente durante 20 min aproximadamente (118). Uma vez seco, o RNA foi solubilizado com 30 μ l de H₂O contendo 0,1 % de dietilpirocarbonato DEPC (Gibco), e 1 μ l de Inibidor de RNase (*RNAase out inhibitor* 40 U/ μ l, Gibco). A integridade do RNA total extraído da amostra foi analisada em gel de agarose-EtBr a 1,5 %.

3.2.2. Transcrição Reversa a partir do RNA total

Com a finalidade de clonar novamente o gene K^b no plasmídeo pVP22/*myc-His*, foram feitas duas transcrições reversas partir da extração de RNA total. A primeira foi realizada com o uso de um kit comercial *Ready to Go* (Amersham Pharmacia Biotech), que permite a síntese de DNA complementar (cDNA) de todos os RNA que contenham caudas poli-A. Portanto, utilizou-se 1 μ l da extração do RNA total junto com a enzima transcriptase reversa do vírus de Leucemia murina (Moloney M-MuLV), seguindo as recomendações do fabricante. Basicamente, um tubo de microcentrífuga contendo todos os reativos necessários para a transcrição reversa incluindo a transcriptase reversa, foi incubado durante 5 min a 37 °C. Ao mesmo tempo 1 μ l do RNA total dissolvido em 32 μ l de H₂O-DEPC foi incubado durante 5 min a 65 °C. Após este período de incubação, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado e incubado por mais 60 min a 37 °C.

Uma outra reação foi realizada nas seguintes condições: 5 μ l da extração do RNA total foram incubados com 2 μ l do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) reverso SKB2 (5'- TCC AGG CAG CTG TCT TCA CGC-3' 200 pM), específico para a amplificação do gene K^b , a 70 °C por 10 min e rapidamente esfriados em gelo. A seguir, foram adicionados 8 μ l do tampão *First Strand* (Gibco) que acompanha a enzima Superscript II, 4 μ l de ditionotretol 0.1 M (DTT, Gibco), 4 μ l de deoxinucleotídeos (dNTPs 10 mM, Gibco) e incubados por 2 min a 42 °C em termociclador. Após a adição de 3 μ l da enzima Superscript II (200 U/ μ l, Gibco), a reação procedeu por mais 50 minutos à mesma temperatura, seguido de uma incubação por 15 min a 70 °C. Finalmente foram adicionados 2 μ l da enzima RNase H (1U/ μ l) seguido de uma incubação a 37 °C durante 20 min.

Ambos cDNAs foram armazenados a -20 °C para uso posterior.

3.2.3. Otimização das condições da reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene que codifica para a cadeia α do MHC de classe I de camundongo K^b de 1.137 pb, foram utilizados como DNA molde os dois cDNAs provenientes das transcrições reversas. A mistura de reação da PCR (50 μ l) foi realizada em diferentes condições para a obtenção de uma banda única e específica. Esta continha: 1 μ l de cada oligonucleotídeo iniciador SKB1e SKB2 (50 pM); 1 μ l de dNTPs (10 mM, Gibco), 2,5 μ l ou 3,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM, Gibco), 5 μ l de tampão de amplificação (10x, Gibco), 0,5 μ l da DNA polimerase *Taq* (5 U/ μ l, Gibco) com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (5 ou 10%), e o cDNA molde (0,25 ou 0,50 μ l) e H_2O MQ estéril. As diferentes condições estão esquematizadas em forma de tabela:

TABELA 2. Otimização das condições da PCR.

Tubos	2	3	4	5	6	7	8	9
cDNA	total	K^b	total	K^b	total	K^b	total	K^b
Vol.cDNA	0.25 μ l	0.25 μ l	0.50 μ l	0.50 μ l	0.25 μ l	0.25 μ l	0.50 μ l	0.50 μ l
[$MgCl_2$]	2,5 mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	3,5mM	3,5mM	3,5mM	3,5mM
DMSO	5 %	5 %	5 %	5 %	10 %	10 %	10 %	10 %

Primer direto SKB1: 5' -CCG ACA GGT GCG ATG GTA CCG-3'

Primer reverso SKB2: 5' -TCC AGG CAG CTG TCT TCA CGC-3'

Figura 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene H-2 K^b . Em itálica encontram-se assinalados os codons de início (ATG) e de terminação da tradução (TGA).

Os tubos de reação foram colocados no termociclador e submetidos ao seguinte programa: 95 °C por 5 min, seguido de 25 ciclos a 95 °C por 30 s, 58 °C por 50 s, 72 °C por 2 min, e finalmente uma última etapa de 72 °C por 5 min para realizar a extensão final.

Uma vez obtida uma banda única, o cDNA escolhido (que provinha da transcrição reversa do RNA específico para o K^b) foi novamente utilizado para a

amplificação e para a clonagem. Para isto, foi utilizada a DNA polimerase Platinum *Pfx* (2,5 U/ μ l, Gibco) com atividade exonucleásica 3'→5' de forma de diminuir os possíveis erros no processo de polimerização. Novamente, a um volume final de 50 μ l foi acrescentado 1 μ l de cada oligonucleotídeo iniciador (SKB1 e SKB2, 50 pM); 1 μ l de dNTPs (10 mM, Gibco), 1,5 μ l de MgSO₄ (50 mM, Gibco), 5 μ l de tampão de amplificação (10x Gibco), e 0,5 μ l da DNA polimerase *Pfx* (2,5 U/ μ l, Gibco), com 0,1 μ l do plasmídeo pBluescriptIISK::K^b ou 0,1 μ l do cDNA anteriormente escolhido, proveniente da transcrição reversa utilizando o primer SKB2 para o K^b. Os tubos de reação foram colocados no termociclador e submetidos ao seguinte programa: 95 °C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 68 °C por 1,5 min. Finalmente uma última etapa de incubação a 68 °C por 30 min para realizar a extensão final e sintetizar produtos de PCR com extremidades cegas. Os produtos obtidos K^b, foram por nós denominados K^bA e K^bB, produto do PCR obtido a partir do plasmídeo pBluescriptIISK::K^b e a partir do cDNA, respectivamente.

3.2.4. Extração dos produtos de PCR K^bA e K^bB do gel

Os produtos de PCR K^bA e K^bB de 1.137 pb obtidos na seção anterior, foram cortados do gel e o DNA extraído com o kit *Concert Gel Extraction* (Gibco), como descrito na seção 3.1.3.. O DNA foi eluído com 20 μ l de Tris-EDTA (TE) pH 8,0. Foram defosforilados com 1 μ l da enzima fosfatase alcalina CIAP (25 U/ μ l, Gibco) durante 5 min a 50 °C, seguido da inativação da enzima pela adição de 0,5 μ l de EDTA pH 8,0, e incubação durante 15 min a 65 °C no termociclador. As amostras foram precipitadas com 0,2:1 de acetato de potássio (2,5 M) e 2,2:1 de etanol absoluto, pela incubação em N₂ líquido durante 5 s, seguida da centrifugação em microcentrífuga a 14.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi aspirado e os tubos incubados de forma invertida a temperatura ambiente durante 20 min aproximadamente. Uma vez seco, os DNAs foram solubilizados com 5 μ l de H₂O MQ.

A reações de clonagem e transformação foram realizadas como descrito nas seções 3.1.4. e 3.1.6. respectivamente.

3.2.5. Reação de ligação dos produtos K^bA e K^bB com o plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO

Para a clonagem do gene que codifica para o K^b , previamente amplificado pela técnica da PCR com a enzima *Pfx*, utilizou-se o plasmídeo pCR-BluntII-TOPO (3.519 pb, Invitrogen) (Figura 6).



Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pCR[®]-Blunt II-TOPO (Invitrogen) e seqüência do sítio de múltipla clonagem. Em destaque na figura estão os principais elementos do plasmídeo: os genes de resistência para canamicina e zeocina; a origem de replicação derivada do plasmídeo pUC, a qual permite a replicação em alto número de cópias; o promotor de lac, *P lac*, que controla a expressão da fusão *lacZ-ccdB*, cujo produto promove a morte celular quando o plasmídeo é ligado sem o inserto. Na parte superior da figura está descrita a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição, assim como o sítio e a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores M13 reverso e M13 direto (-20) utilizados na reação de seqüenciamento.

A reação foi realizada segundo instruções do fabricante (119). Resumidamente, 4 µl do produto do PCR purificado do gel e defosforilado (K^bA ou K^bB) foram misturados com 1 µl do vetor TOPO (10 ng/µl, Invitrogen) e 1 µl de uma solução salina (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂, Invitrogen). A reação procedeu à temperatura ambiente durante 30 min. Após o término da mesma, as ligações pCRBluntII::K^b (A e B), foram armazenadas a – 20 °C, até a transformação por choque térmico.

3.2.6. Transformação de *E. coli* Top10 com pCRBluntII::K^b por choque térmico

Uma alíquota da mistura de ligação de pCRBluntII::K^bA ou pCRBluntII::K^bB (2 µl) foi adicionada a um tubo com 50 µl de células *E. coli* Top10 para a transformação por choque térmico. Após a incubação por 30 min em banho de gelo, a mistura foi submetida a choque térmico a 42 °C por 30 s sem agitação e transferida imediatamente para banho de gelo. As células foram suplementadas com 250 µl de meio SOC, e agitadas a 200 rpm. Após 1 hora de incubação a 37 °C, toda a cultura foi semeada em meio LB suplementado com agar (1,5 %) e o antibiótico canamicina (50 µg/ml) (119). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Imperial III Incubator, Lab Line) por 24 horas a 37 °C.

3.2.7. Análise dos clones recombinantes Top10/pCRBluntII::K^b

Nove colônias isoladas da transformação Top10/pCRBluntII::K^bA (PCR a partir do pBSK::K^b) e 10 colônias isoladas da transformação Top10/pCRBluntII::K^bB (PCR a partir do cDNA) foram repicadas em 4 ml de meio LB-canamicina (50 µg/ml) e cultivadas durante 18 h a 37 °C com agitação para a extração do plasmídeo, conforme a seção 3.1.7.. O DNA plasmidial foi eluído com 35 µl de H₂O MQ.

Para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, 2 µl de cada DNA plasmidial foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *EcoR* I (10U/µl, Gibco) contendo 1 µl do tampão da enzima (10x) em um volume final de 10 µl. As reações foram incubadas por 2h a 37 °C em termociclador.

3.2.8. Seqüenciamento automático dos clones pCRBluntII::K^b

Com o objetivo de confirmarmos a seqüência original da molécula de K^b, excluindo-se a ocorrência de mutações, e determinar qual dos 19 clones seria utilizado nas seguintes clonagens nos plasmídeos pCIneo e pVP22/*myc*-His foi realizado o seqüenciamento. Para isso, o fragmento K^b nos diferentes clones Top10/pCRBluntII::K^b construídos foi seqüenciado, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech). Este seqüenciador utiliza a estratégia descrita por Sanger *et al.* de terminação de cadeia pela incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) (120).

Em uma primeira etapa prévia ao seqüenciamento, se realizou-se a mistura de reação utilizando 4 µl da pré-mistura (*DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing*, Amersham Pharmacia Biotech) que continha a enzima Thermo sequenase II, ddNTPs marcados com fluoresceína e rodamina, e 0,5 µl do oligonucleotídeo iniciador M13 direto (-20) ou reverso (5 µM), acrescentados com 5,5 µl do DNA a ser seqüenciado.

Oligonucleotídeo iniciador direto M13 (-20) 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Oligonucleotídeo iniciador reverso M13 5'- GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

As amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a 30 ciclos de: 95 °C por 20 seg., 50 °C por 15 seg. e 60 °C por 1 min. Ao término da reação, foram adicionados 2 µl de acetato de sódio 7,5 M e 60 µl de etanol 96 %. Foram centrifugadas a 5.300 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 200 µl de etanol 70 % e solubilizado em 10 µl de uma solução de corrida.

Em uma segunda etapa as amostras foram injetadas no aparelho por capilaridade durante 75 s a 2 kV, e separadas durante 300 min a 5 kV.

Por último, as seqüências resultantes foram comparadas à publicada no banco de dados do *Gene Bank*, através do programa de computação BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3.2.9. Clonagem do fragmento K^b nos plasmídeos pVP22/myc-His e pCIneo

O clone Top10/pCRBluntII::K^bB7, cujo inserto foi sintetizado a partir da transcrição reversa foi escolhido para as próximas sub-clonagens por não apresentar mutações em toda sua seqüência. Para liberar o fragmento K^b de 1.225 pb inserido entre os sítios *Spe* I e *Xba* I no plasmídeo pCRBluntII, 12 µl do plasmídeo recombinante previamente purificado foram digeridos, utilizando-se 15 U da enzima de restrição *Xba* I (10 U/ µl, Gibco), 15 U de *Spe* I (10 U/ µl, Promega), e 3 µl do tampão Multicore (10x, Promega) em 30 µl de volume final. A reação procedeu a 37 °C durante 18 h no termociclador. O produto da digestão foi observado em gel de agarose-EtBr (1,5 %), e o fragmento K^b do tamanho adequado (1.225 pb) foi eluído do gel com o kit *Concert Gel Extraction* (Gibco) em 20 µl de Tris-EDTA pH 8,0, como descrito na seção 3.1.3..

Ambos os plasmídeos, pVP22/myc-His e pCIneo (Figuras 3 e 2) (10 µl de cada um) foram digeridos com 10 U de *Xba* I (10 U/µl, Gibco), e 1,5 µl do tampão 2 10x (Gibco) em um volume final de 15 µl e incubados durante 4 h a 37 °C no termociclador. Após este período, ambos foram defosforilados com 1 µl da enzima fosfatase alcalina CIAP (25 U/µl, Gibco) durante 5 min a 37 °C, seguido da inativação da enzima pela adição de 0,5 µl de EDTA pH 8,0, e incubação durante 15 min a 65 °C no termociclador. As amostras foram precipitadas com 0,2 :1 de acetato de potássio (2,5 M) e 2,2 :1 de etanol absoluto, incubadas durante 5 s em N₂ líquido e centrifugadas em microcentrifuga a 14.000 rpm durante 10 min. O precipitado foi lavado com 100 µl de etanol ao 70 %. Uma vez seco foi solubilizado com 5 µl de H₂O MQ.

As clonagens foram feitas em um volume final de 15 µl com 0,5 µl do plasmídeo linearizado e defosforilado, 5 µl do inserto, 3 µl do tampão da enzima (5x, Gibco), e 1 µl da enzima T4 DNA Ligase (1U/µl, Gibco). Foram incubadas durante 18 horas a 22 °C no termociclador. Dois controles negativos, nos quais o inserto ou o plasmídeo não foram adicionados à reação, foram incluídos e o volume final foi completado com H₂O MQ.

3.2.10. Transformação de *E. coli* Top10 com pVP22::K^b e pCIneo::K^b

Para cada transformação foi utilizado um tubo com 100 µl de células eletrocompetentes *E. coli* Top10 armazenadas a -80°C. As células foram descongeladas em banho de gelo durante 30 min e uma alíquota da ligação de pVP22::K^b ou pCIneo::K^b (5 µl) foi adicionada a cada tubo. A mistura permaneceu no gelo por 30 min e após esse período foi transferida a uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (Bio RAD). A eletroporação (Gene Pulser System, Bio RAD) foi realizada nas seguintes condições: 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF. As células foram suplementadas com 2,0 ml de meio LB, e agitadas a 250 rpm durante 1 hora de incubação a 37 °C. Após uma hora, 10 µl e 100 µl da cultura foram semeados em meio LB sólido (agar 1,5 %) suplementado com o antibiótico carbenicilina (50 µg/ml). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

3.2.11. Análise dos clones recombinantes Top10/pVP22::K^b e Top10/pCIneo::K^b

Para determinar a presença dos plasmídeos recombinantes pVP22::K^b e pCIneo::K^b nas células Top10 transformadas, seis colônias isoladas da transformação Top10/pVP22::K^b e 6 colônias isoladas da transformação Top10/pCIneo::K^b foram repicadas em 4 ml de LB-Carbenicilina (50 µg/ml) e crescidas durante 18 h a 37 °C em banho com agitação para a purificação do plasmídeo como descrito na seção 3.1.7.. Uma alíquota (1µl) de DNA plasmidial de cada amostra foi analisada em gel de agarose-EtBr e 2 µl foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *Kpn* I (10 U/µl, Gibco) e 1 µl do tampão de reação 4 (10x, Gibco) em 10 µl de volume total de reação, incubados a 37 °C durante 4 h em termociclador para a determinação da orientação do inserto.

3.2.12. Seqüenciamento automático dos clones pVP22::K^b e pCIneo::K^b

Para demonstrar a presença do inserto K^b na orientação 5' → 3' nos novos vetores pVP22::K^b e Top10/pCIneo::K^b, foram escolhidos e seqüenciados automaticamente um recombinante de cada clonagem Top10/pVP22::K^b1 e Top10/pCIneo::K^b4 como descrito na seção 3.2.8..

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no seqüenciamento automático.

Vetor	Oligon. iniciadores	Seqüência 5'→3'
pVP22/ <i>myc</i> -His	pVP22 direto	GGC CAC GGC GAC TCG A
pVP22/ <i>myc</i> -His	pcDNA3.1/BGH reverso	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
pCIneo	T7 EEV	AAG GCT AGA GTA CTT AAT ACG A
pCIneo	T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA

3.2.13. Cultura de células de câncer de ovário de *hamster* (CHO-K1)

Para cultura de células *in vitro*, foram utilizadas as células de ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) CHO-K1 (ATCC: CCL-61). Esta linhagem é um subclone derivado da linhagem celular CHO, isolada por T. T. Puck a partir de uma biópsia de ovário de hamster Chinês adulto em 1957 (<http://www.atcc.org>).

As células CHO foram cultivadas a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO₂ em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Gibco) inativado durante 30 min a 56 °C, 1% de uma solução de streptomomicina-penicilina (10.000 g/ml, 10.000 U/ml, Gibco), e 0.1 % de gentamicina (10mg/ml, Gibco). Este meio foi denominado DMEM completo. Quando a população celular atingiu uma confluência de 80 % (Microscópio de campo invertido Axiovert 25, Zeiss) as células foram subcultivadas. Basicamente, o meio de cultura foi removido com aspiração, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com uma solução de tripsina (0,5%)-EDTA (5,3 mM, Gibco) por 3 min em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂. A mesma quantidade de meio DMEM completo foi adicionado para inibir a ação da tripsina e as células foram centrifugadas (MSE Mistral 2000) por 3 min a 1.500 rpm. O sobrenadante foi removido e as células foram resuspendidas em novo meio de cultura para futuros experimentos ou congeladas em FBS contendo 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, 10 %) e armazenadas em N₂ líquido a -196 °C.

3.2.14. Transformação de CHO com pVP22::K^b e pCIneo::K^b

Para a transformação, o experimento foi realizado com 10⁸ células CHO. As células foram lavadas com PBS e incubadas com 10 ml de solução de dissociação celular não enzimática (Gibco) durante 30 min a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO₂. As células foram centrifugadas por 3 min a 1.500 rpm e resuspendidas com 800 µl de DMEM contendo 20 µl dos plasmídeos previamente seqüenciados pVP22::K^b ou pCIneo::K^b. A mistura foi resfriada em banho de gelo por 10 min e transferida para uma cubeta de 0,4 cm (BIO RAD). A eletroporação foi realizada utilizando o dispositivo *Capacitance extender* (BIO RAD) nas seguintes condições: 0,25 kV, e 950 µF. Após a transformação a mistura foi novamente resfriada em banho de gelo por 10 min e cultivadas em meio DMEM completo. As células foram incubadas a 37 °C em estufa com CO₂ 5 % durante 48 h. Após esse período, foi adicionado DMEM completo suplementado com o antibiótico G-418 (geneticina 1.000 µg/ml) (DMEM + G-418). Uma vez passado o tempo de morte celular pela seleção com o antibiótico (aproximadamente 3 semanas), as células foram plaqueadas em DMEM completo com G-418 (500 µg/ml).

3.2.15. Extração do RNA total das células em cultura

Para determinar a expressão do mRNA do gene K^b, foi necessário realizar a extração de RNA. O RNA total das células transfectadas (10⁴ céls) CHO/pVP22::K^b, CHO/pCIneo::K^b e das células CHO controle não transfectadas foi isolado utilizando uma solução de TRIZOL LS Reagent (Gibco). A monocamada de células foi tripsinizada e lavada uma vez com PBS. Após, foram resuspendidas em 200 µl de PBS e 600 µl de TRIZOL LS (Gibco) e incubadas por 5 min à temperatura ambiente, seguida da adição de 160 µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas durante 15 seg., incubadas 10 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 10.400 rpm por 15 min a 4 °C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 400 µl de álcool isopropílico, as amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente e novamente, centrifugadas por 10 min nas mesmas condições. Os três precipitados foram lavados

com 800 µl de etanol ao 75 %, e centrifugados a 8.400 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos incubados de forma invertida a temperatura ambiente durante 30 min aproximadamente. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados em 100 µl de H₂O-dietilpirocarbonato (DEPC 0,1 %, Gibco) com 1µl de inibidor de RNase (Gibco, 40 U/µl) (121). A integridade do RNA total extraído das três amostras foi analisada em gel de agarose-EtBr a 1,5 %.

3.2.16. Tratamento do RNA com a enzima DNase I

Para evitar uma possível contaminação por DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I (DNase I 10 U/µl, Gibco). Esta enzima cliva DNA de fita simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. Assim, 5 µl de cada extração de RNA total foram digeridos com 10 U da enzima em um volume final de 10 µl, durante 15 min a temperatura ambiente. Logo, a enzima foi inativada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM e incubadas por 10 min a 65 °C.

3.2.17. Transcrição Reversa e reação em cadeia da polimerase

Uma vez obtido o RNA total a partir das células em cultura e tratado com a DNase I, foi realizada a transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA) e subsequente PCR utilizando-se a enzima Superscript II e os *oligonucleotídeos iniciadores* oligos-dT₁₂₋₁₈ (Gibco). Para cada reação, 3 µl da extração de RNA total foram utilizados, junto com 1 µl da enzima Superscript II (Gibco, 200 U/µl), 5 U do inibidor de RNase (Gibco, 10 U/µl), 0,2 µl de oligos-dT₁₂₋₁₈, 2 µl de DTT (Gibco), 2 µl de dNTPS (Gibco, 10 mM), 2 µl de MgCl₂ (50 mM), 4 µl de tampão da enzima (Gibco, 5x), e H₂O-MQ até completar 20 µl. As reações foram incubadas no termociclador e submetidas ao seguinte programa: 10 min a 25 °C, 45 min a 42 °C, e 3 min a 99 °C.

O fragmento de 1.137 pb correspondente ao K^b, foi amplificado pela técnica da PCR com os *oligonucleotídeos iniciadores* SKB1 e SKB2, nas as mesmas condições como descrito na seção 3.2.3. com a enzima *Taq* polimerase (Gibco, 5 U/µl).

Para demonstrar que a ausência de expressão do K^b nas células CHO não transfectadas não se devia a um problema na extração do RNA, também foi amplificado o gene que codifica para a enzima de expressão constitutiva gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH). Assim, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para GAPDH de hamster chinês que amplificam um fragmento de 1.001 pb.

Oligonucleotídeo específico direto 5' -ATG GTG AAG CTC GGC GTG AAC-3'

Oligonucleotídeo específico reverso 5' -TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTA G-3'

Os tubos de reação foram colocados no termociclador e submetidos ao seguinte programa: 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 2 min, e finalmente uma última etapa de 72 °C por 10 min para realizar a extensão final.

3.2.18. Citometria de fluxo para a detecção da expressão da proteína K^b

Para demonstrar a expressão da proteína K^b nas células CHO transfectadas, as mesmas foram analisadas por citometria de fluxo. Esta técnica permite detectar a presença da proteína tanto na superfície como no citoplasma das células analisadas. Para isso, as células CHO previamente transfectadas CHO/pVP22:: K^b e CHO/pCIneo:: K^b ou não transfectadas foram tripsinizadas e lavadas com PBS.

Rapidamente as células foram resuspendidas na solução que continha o anticorpo monoclonal primário de camundongo anti- K^b (IgG1a, 0,5 mg/ml, BD Biosciences) diluído 1:10 em PBS-BSA (2 %), e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Logo foram lavadas duas vezes com PBS-BSA e incubadas com o anticorpo secundário produzido contra IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:10 na mesma solução nas condições anteriores. Após o término da incubação, as células foram lavadas com PBS-BSA, fixadas com paraformaldeído (1% em PBS) por um tempo superior a 15 min em gelo. A detecção das amostras foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

A ausência de expressão da proteína K^b na superfície das células CHO transfectadas com o plasmídeo pVP22:: K^b nos levou a utilizar um segundo protocolo. Aqui as células CHO/pVP22:: K^b e CHO/pCIneo:: K^b foram solubilizadas em 500 μ l de uma solução permeabilizante (1x, BD Biosciences), incubadas por 10 min no escuro a temperatura ambiente prévia ao tratamento com os anticorpos, como explicado acima.

3.2.19. Imunofluorescência para detecção da proteína K^b

As células CHO previamente transfectadas CHO/pVP22:: K^b e CHO/pCIneo:: K^b , ou não transfectadas foram semeadas em duplicatas em placas de 96 poços 24 h antes do experimento. No dia seguinte, foram escolhidos os poços com confluência inferior a 80 %. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Para a permeabilização, as células foram tratadas com uma solução de formaldeído (3,7 % em PBS) por 10 min, seguida de uma incubação com metanol ao 100 % durante 6 min a -20 °C. Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas durante 40 min a 37 °C em estufa de CO₂ ao 5 % com uma solução que continha o anticorpo monoclonal primário de camundongo anti- K^b diluído 1:10 em PBS-BSA (2 %). As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário produzido contra IgG de camundongo, marcado com FITC diluído 1:30 na mesma solução. Após o término da incubação, o sobrenadante foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com de PBS (122). As células foram observadas ao microscópio de campo invertido Axiovert 25 (Zeiss, Germany) com lâmpada fluorescente HBO 50.

4. RESULTADOS

Como ponto de partida deste trabalho foi realizada uma subclonagem do gene que codifica para o K^b , uma molécula do MHC de classe I de camundongo, previamente clonada no plasmídeo pBluescriptSKII:: K^b , em pCIneo, dando origem ao plasmídeo pCIneo:: K^b e posterior subclonagem do K^b no plasmídeo pVP22/*Myc*-His, dando origem ao plasmídeo pVP22:: K^b .

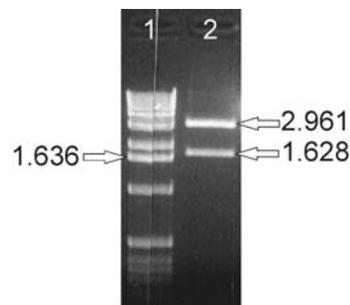


Figura 7. Digestão do plasmídeo pBluescriptII:: K^b com *EcoR* I. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), coluna 2: pBluescriptII:: K^b com digerido com *EcoR* I liberando os fragmentos de 1.628 e 2.961 pb correspondentes ao inserto K^b e ao vetor pBluescriptII, respectivamente .

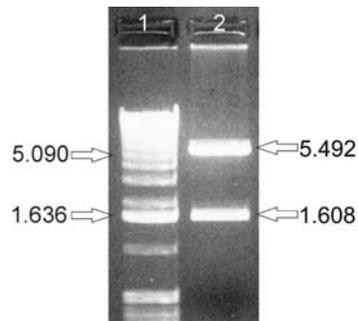


Figura 8. Digestão do plasmídeo pCIneo:: K^b com *Not* I. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), coluna 2: pCIneo:: K^b digerido com *Not* I liberando os fragmentos de 1.608 e 5.492 pb correspondentes ao inserto K^b e ao plasmídeo pCIneo, respectivamente.

Conforme demonstrado na figura 7, o plasmídeo pBluescriptII:: K^b foi digerido com a enzima de restrição *EcoR* I, liberando um fragmento de 1.628 pb

correspondente ao inserto K^b . Este fragmento foi subclonado no plasmídeo pCIneo no sítio de restrição para *EcoR* I. Como mostrado na figura 8, um dos clones pCIneo:: K^b obtidos, foi digerido com a enzima de restrição *Not* I, liberando o fragmento de 1.608 pb, e demonstrando a presença do mesmo na posição $5' \rightarrow 3'$. A presença de dois fragmentos de 90 e 7.010 pb na digestão com *Not* I indicariam um clone recombinante não desejado com o inserto K^b na orientação $3' \rightarrow 5'$. O clone mostrado na figura 8, foi utilizado para a subclonagem do inserto no plasmídeo pVP22/*Myc*-His. Novamente os clones pVP22:: K^b obtidos foram clivados com a mesma enzima de restrição *Not* I. A presença dos fragmentos de 1.598 e 6.457 pb indicam a posição do inserto K^b na orientação $3' \rightarrow 5'$, como mostrado na figura 9. Nenhum dos clones analisados apresentava os fragmentos de 77 e 7.978 pb correspondentes a inserção do inserto no sentido $5' \rightarrow 3'$. Conseqüentemente, novos clones recombinantes pVP22:: K^b foram cultivados e foi feita uma nova extração de plasmídeo. Da mesma forma, todos os clones apresentaram o inserto clonado no sentido invertido $3' \rightarrow 5'$ (dados não mostrados).

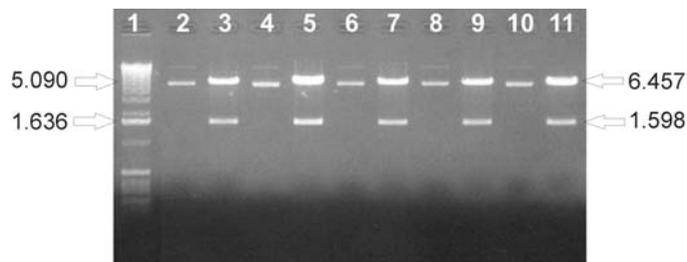


Figura 9. Seleção dos clones recombinantes pVP22:: K^b pela análise do padrão de restrição com *Not* I para determinação da correta orientação do fragmento K^b em pVP22. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); colunas 2, 4, 6, 8, 10: clones recombinantes pVP22:: K^b não clivados; colunas 3, 5, 7, 9, 11: clones recombinantes pVP22:: K^b clivados com *Not* I liberando os fragmentos de 1.598 e 6.457 pb, que indicam a orientação do inserto K^b no sentido invertido $3' \rightarrow 5'$.

Devido à indisponibilidade de clones contendo o inserto na orientação correta, foi feita uma extração de RNA com TRIZOL a partir do baço de um camundongo

C57BL/6 que expressa a molécula de MHC de classe I H-2K^b. O rendimento da extração (7,1 µg/µl) (Figura 10) possibilitou a utilização desse RNA como molde para a transcrição reversa.

Para realizar a transcrição reversa, e posterior PCR foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos (SKB1 e SKB2) que incluem o sítio de iniciação e de terminação UGA (TCA) da tradução (Figura 5). A partir do oligonucleotídeo específico reverso específico para o K^b SKB2, foi realizada uma transcrição reversa. Ao mesmo tempo, foi realizada uma segunda transcrição reversa onde foram obtidos os cDNAs de todos os mRNA expressos no momento da obtenção do tecido utilizando uma coluna de oligo-dT (Figura 10).

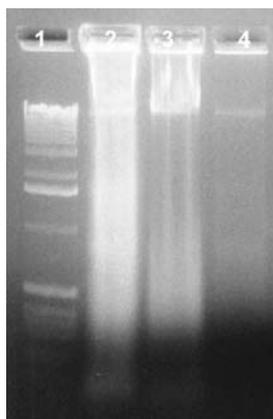


Figura 10. Produto da extração do RNA do baço de um camundongo C57BL/6 (H2-K^b) e transcrição reversa de ácidos ribonucléicos. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); coluna 2: extração de RNA total; coluna 3: produto da transcrição reversa (cDNA) a partir do RNA mensageiro obtido com coluna de oligo-dT; coluna 4: produto da transcrição reversa (cDNA) a partir do RNA mensageiro obtido com o oligonucleotídeo específico reverso SKB2.

A figura 11 mostra o resultado das estratégias empregadas para a otimização da amplificação da reação em cadeia da polimerase da molécula K^b, testando diferentes concentrações de magnésio (MgCl₂) e de dimetilsulfóxido (DMSO), usando como molde o cDNA obtido da coluna de oligo-dT ou obtido com o oligonucleotídeo

reverso específico SKB2. A melhor condição encontrada foi a correspondente à coluna 7, a partir de 0.25 μ l de cDNA molde proveniente do SKB2 contendo 3,5 mM de $MgCl_2$ e 10 % de DMSO. Este cDNA e o do plasmídeo pBluescriptSKII::K^b foram amplificados por PCR com a enzima *Pfx* para posterior clonagem (Figura 12).

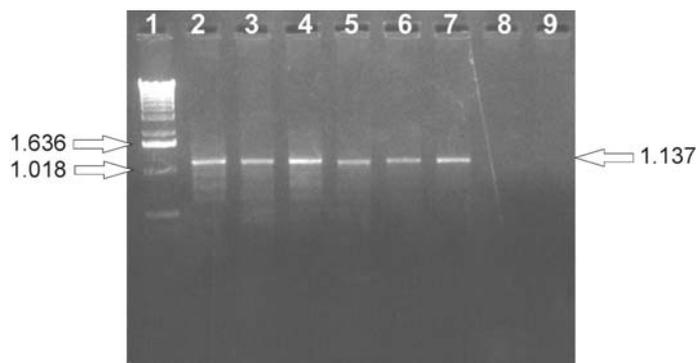


Figura 11. Resultado da otimização da técnica de PCR para a amplificação de gene K^b de 1.137 pb. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); colunas 2-5, $MgCl_2$ 2,5 mM, DMSO 5 %; colunas 6-9, $MgCl_2$ 3,5 mM, DMSO 10 %. As colunas 2, 4, 6, 8 foram feitas a partir da transcrição reversa da PCR de cDNA total, as colunas 3, 5, 7, 9 foram feitas a partir da transcrição reversa da PCR de cDNA do K^b.

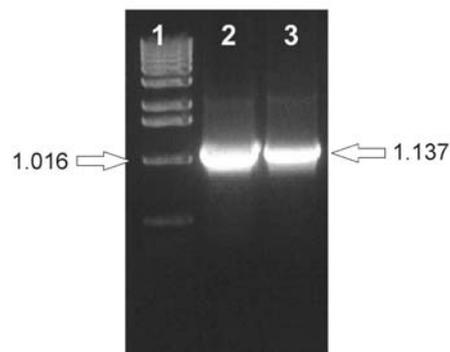
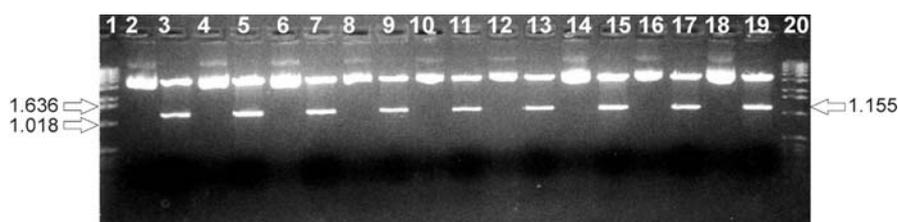


Figura 12. Produto da PCR gerado com a enzima polimerase *Pfx*. Gel de agarose a 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); coluna 2, produto da PCR a partir do pBluescriptII::K^b; coluna 3, produto da PCR a partir da transcrição reversa do cDNA do K^b.

Ambos fragmentos K^bA e K^bB , foram clonados no sítio de múltipla clonagem do plasmídeo linearizado pCR-BluntII-TOPO. A presença do inserto K^b foi detectada em 100 % dos clones analisados, o que significou 9 colônias recombinantes pCRBluntII:: K^bA (Figura 13a) e 10 colônias recombinantes pCRBluntII:: K^bB (Figura 13b). As colônias recombinantes detectadas pela análise do padrão de restrição com a enzima *EcoR* I liberaram um fragmento levemente maior ao anteriormente clonado (1.137 pb) de 1.155 pb que corresponde à soma das bases adicionais (18 pb) até os sítios de restrição da enzima *EcoR* I.

a)



b)

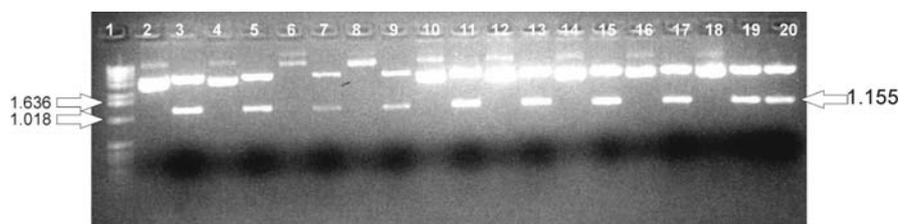


Figura 13. Padrão de digestão dos clones recombinantes pCRBluntII:: K^b gerados com *EcoR* I. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. a) coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), colunas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: clones recombinantes pCRBluntII:: K^bA não clivados, colunas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19: clones recombinantes clivados com *EcoR* I liberando o fragmento clonado K^bA de 1.155 pb. b) coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), colunas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: clones recombinantes pCRBluntII:: K^bB não clivados, colunas 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20: clones recombinantes clivados com *EcoR* I liberando o fragmento clonado K^bB de 1.155 pb.

Uma vez confirmada a presença do inserto por digestão com enzimas de restrição, os clones pCRBluntII:: K^b foram sequenciados para posterior escolha do

clone a ser subclonado. O resultado dos seqüenciamentos está representado tanto na forma de eletrofluorograma, assim como no código de quatro letras A, C, G, T. As figuras 14, 15, e 16 mostram a seqüência obtida do clone pCRBluntII::K^bB7 realizado com os oligonucleotídeos iniciadores M13 (-20) direto e M13 reverso. A figura 14 mostra a seqüência obtida com o oligonucleotídeo específico M13 direto. Foi possível seqüenciar mais de 860 bases, 492 corretas por comparação com a seqüência publicada no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov; n° de acesso U47328, figura 2). As bases 95, 96, e 97 correspondem ao códon de iniciação ATG. Por comparação com a seqüência publicada, a seqüência obtida a partir do seqüenciamento automático observada na figura 14 apresenta a deleção de uma citosina entre a guanina (G128) e a citosina (C129), **C35** na seqüência do K^b. Porém, um novo seqüenciamento, mostrado na figura 15, mostra que, na realidade não se trata de uma deleção e sim talvez de uma sobreposição dos picos G128 e C129 do eletrofluorograma, já que aparece a **C35** na posição 148 no novo seqüenciamento (figura 15). A figura 16 mostra o seqüenciamento com o oligonucleotídeo específico reverso M13. Aqui foram analisadas mais de 750 bases, das quais 631 estão corretas. As bases 77, 78, e 79 correspondem-se ao códon de terminação UGA (TCA). Existe uma região de superposição entre o seqüenciamento 14 e 16, da C479 até a G492 que demonstra que todo o inserto K^b foi seqüenciado, e que a seqüência está correta.

Figura 14. Legenda na próxima página.

Figura 14 (continuação). Seqüência obtida pelo método de incorporação de dideoxynucleotídeos do clone pCRBluntII::K^b com o oligonucleotídeo específico direto M13 (-20). O clone pCRBluntII::K^bB7 foi seqüenciado pelo método de dideoxynucleotídeos marcados, em seqüenciador automático *MEGABace* com o oligonucleotídeo específico direto M13 (-20). Por comparação com a seqüência publicada no *Gene Bank*, foram seqüenciadas mais de 658 bases corretamente. As bases A95, T96, e G97 (ATG) codificam para o códon de início da tradução.

Figura 15. Demonstração da presença da base C35 no clone pCRBluntII::K^b por seqüenciamento automático. O clone pCRBluntII::K^bB7 foi novamente seqüenciado pelo método de dideoxynucleotídeos marcados, com o oligonucleotídeo específico direto M13 (-20). As bases A114, T115, E G116 (ATG) codificam para o códon de início da tradução. A seta indica a presença da base C35.

Figura 16. Legenda na próxima página.

Figura 16 (continuação). Seqüência obtida pelo método de incorporação de dideoxinucleotídeos marcados em seqüenciador automático, do clone pCRBluntII::K^b com o oligonucleotídeo específico reverso M13. O clone pCRBluntII::K^b foi seqüenciado pelo método de dideoxinucleotídeos marcados, em seqüenciador automático MEGABace com o oligonucleotídeo específico reverso M13. Por comparação com a seqüência publicada, foram seqüenciadas 708 bases corretamente. As bases T77, C78, e A79 (UGA) codificam para o códon de terminação da tradução

Este clone foi escolhido para a subclonagem nos vetores pVP22/*myc*-His e pCIneo, por não apresentar mutações na seqüência analisada. Ambos vetores foram clonados utilizando-se a mesma estratégia, pela clivagem com a enzima *Xba* I e posterior defosforilação. O inserto K^b foi clivado com as enzimas compatíveis *Spe* I e *Xba* I, como mostra a Figura 17, liberando um fragmento de 1.225 pb.

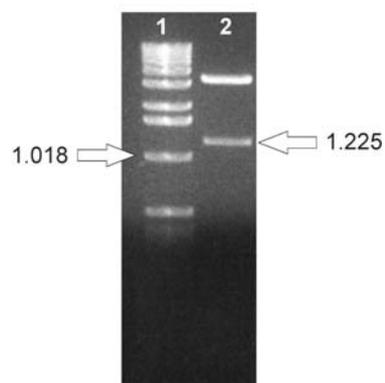


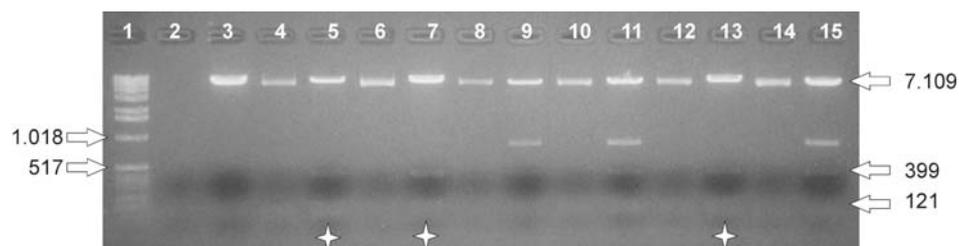
Figura 17. Purificação do inserto K^b a partir do clone seqüenciado pCRBluntII:: K^b B7 para posterior clonagem nos vetores pVP22 e pCIneo. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1 kb); colunas 2, 3: pCRBluntII:: K^b B7 clivado com *Xba* I e *Spe* I e liberando o fragmento de 1.225 pb.

Este fragmento foi clonado nos plasmídeos pVP22 e pCIneo, dando origem aos plasmídeos recombinantes pVP22:: K^b e pCIneo:: K^b . Para a determinação da correta orientação do inserto, seis colônias isoladas de cada transformação foram repicadas em meio líquido seletivo contendo carbenicilina. Após a extração dos plasmídeos, estes foram clivados com *Kpn* I.

O padrão de digestão do plasmídeo pVP22:: K^b contendo o inserto na correta orientação deve apresentar segmentos de DNA de 7.109, 399, e 121 pb, como observado nos clones 1, 2, e 5 (Figura 18a). Quando o fragmento se encontra na orientação invertida, é observado um padrão de digestão pela enzima de restrição *Kpn* I de 6.385, 845, e 399 pb (clones 3, 4, e 6, Figura 18a).

Da mesma forma, seis clones pCIneo::K^b foram digeridos com *Kpn* I e analisados, achando-se somente um que apresentou o padrão de bandas esperadas de 4.533, 1.712, 399, e 121 pb (clone 5, Figura 18b). A banda de 121 pb presente no gel, não foi observada na fotografia *Polaroid*. Em dois clones (2 e 5) o inserto estava posicionado na orientação invertida 3 → 5 (bandas de 4.533, 988, 777 e 399 pb), e os 3 restantes não apresentavam o inserto (clones 2, 4 e 6) por comparação com o controle pCIneo (bandas de 4.533 e 939 pb) (Figura 18b).

a)



b)

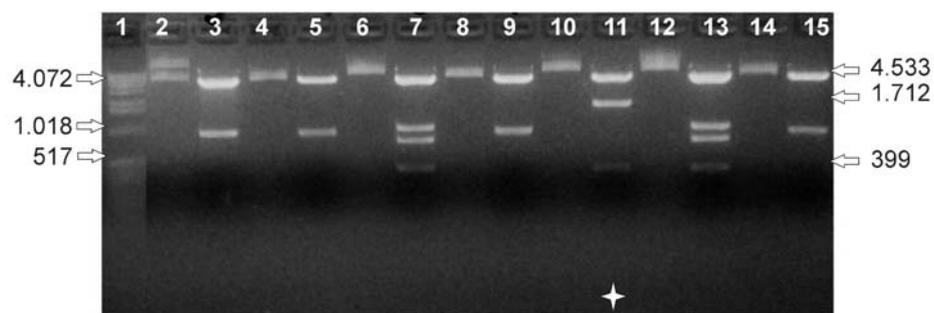


Figura 18. Resultado da seleção dos clones recombinantes pela análise do padrão de restrição com *Kpn* I para determinação da correta orientação do fragmento K^b em ambos plasmídeos pVP22:: K^b (a) e pCIneo:: K^b (b). Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. a): coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), coluna 3: pVP22 não recombinante clivado com *Kpn* I; colunas 4, 6, 8, 10, 12, 14: clones recombinantes pVP22:: K^b não clivados; colunas 5, 7, 9, 11, 13, 15: clones recombinantes pVP22:: K^b clivados com *Kpn* I. Os clones marcados com asterisco apresentam o inserto na orientação correta $5' \rightarrow 3'$, fornecendo os fragmentos esperados de 7.109, 399, e 121 pb. b): coluna 1: marcador de peso molecular (1kb), coluna 2: pCIneo sem inserto e não clivado; coluna 3: pCIneo sem inserto clivado com *Kpn* I; colunas 4, 6, 8, 10, 12, 14: clones recombinantes pCIneo:: K^b não clivados com *Kpn* I; colunas 5, 7, 9, 11, 13, 15: clones recombinantes pCIneo:: K^b clivados com *Kpn* I. O clone marcado com asterisco apresenta o inserto na orientação correta $5' \rightarrow 3'$, determinado pela presença dos fragmentos esperados liberados de 4.533, 1.712, 399, e 121 pb (clone 4).

Os clones 1 e 4 de pVP22::K^b e pCIneo::K^b, respectivamente foram escolhidos para transfectar células CHO em cultura. Porém, antes de realizar a transfecção nas células em cultura, ambos clones foram seqüenciados para demonstrar a presença do inserto K^b em ambos plasmídeos. As figuras 19 e 20 mostram o resultado dos seqüenciamentos do clone pCIneo::K^b4 realizado com os oligonucleotídeos iniciadores direto T7 EEV e reverso T3. A figura 19 mostra a seqüência obtida com o oligonucleotídeo específico direto. Novamente, por comparação com a seqüência do K^b publicada no banco de dados do *Gene Bank*, foi possível seqüenciar 344 bases corretamente. As bases 50, 51, e 52 correspondem ao códon de iniciação ATG. A figura 20 mostra o seqüenciamento do mesmo clone pCIneo::K^b4 obtido com o oligonucleotídeo reverso específico T3. Aqui, 312 bases foram seqüenciadas, as bases T276, C277 e A278 correspondem ao códon de terminação UGA (TCA) da tradução. A seqüência descrita na figura 20 não demonstra a G859 da seqüência do K^b, (entre bases G26 e C27 no eletrofluorograma), porém o eletrofluorograma apresenta um discreto pico na sua posição o que indicaria a presença desta base.

Figura 19. Demonstração da presença do gene K^b no clone pCIneo:: K^b pelo método de seqüenciamento automático com o oligonucleotídeo específico direto T7 EEV. O clone 4 de pCIneo:: K^b foi seqüenciado pelo método de dideoxinucleotídeos marcados, em seqüenciador automático MEGABace com o oligonucleotídeo específico direto T7 EEV. Por comparação com a seqüência publicada, foram seqüenciadas 344 bases corretamente. As bases A50, T51, E G52 (ATG) codificam para o códon de início da tradução.

Figura 20. Demonstração da presença do gene K^b no clone pClneo:: K^b pelo método de seqüenciamento automático com o oligonucleotídeo específico reverso T3. O mesmo clone 4 de pClneo:: K^b foi seqüenciado pelo método de dideoxinucleotídeos marcados, em seqüenciador automático MEGABace com o oligonucleotídeo específico reverso pCDNA3.1. Por comparação com a seqüência publicada, foram seqüenciadas 278 bases corretamente. As bases T276, G277, e A278 codificam para o códon de terminação da tradução (UGA).

A figura 21 mostra o resultado do seqüenciamento obtido com o clone pVP22::K^b1 utilizando o oligonucleotídeo específico reverso pCDNA3.1. Foram seqüenciadas mais de 630 bases, das quais 544 não apresentaram nenhuma mutação. Neste seqüenciamento, as bases T133, C134 e A135 correspondem ao códon de terminação UGA (TCA). A clonagem do fragmento K^b no plasmídeo pVP22/*myc*-His foi demonstrada através da destruição do sítio da enzima *Xba* I (T'CTAGA), e formação de uma nova seqüência TCTAGT (bases 81-86) resultante da clonagem com a enzima de restrição *Spe* I (A'CTAGT). O plasmídeo recombinante pVP22::K^b1 também foi seqüenciado com o oligonucleotídeo específico direto pVP22, porém o resultado desse seqüenciamento não foi satisfatório, devido ao grande número de bases inseridas e erradas, quando comparado com a seqüência original publicada no banco de dados (dados não apresentados).

Figura 21. Demonstração da presença do gene K^b no clone pVP22:: K^b pelo método de seqüenciamento automático com o oligonucleotídeo específico reverso pCDNA3.1. O clone 1 de pVP22:: K^b foi seqüenciado pelo método de dideoxinucleotídeos marcados, em seqüenciador automático MEGABace com o oligonucleotídeo específico reverso pCDNA3.1. Por comparação com a seqüência publicada, foram seqüenciadas 544 bases corretamente. As bases T133, C134, e A135 codificam para o códon de terminação da tradução (UGA). As bases 81-86 demonstram a formação de uma nova seqüência TCTAGT, pela clonagem do inserto com enzimas com extremidades compatíveis (*Xba* I e *Spe* I).

Os plasmídeos recombinantes pVP22::K^b1 e pCIneo::K^b4 seqüenciados foram utilizados para transfectar células CHO em cultura. 48 horas após a transfecção, as células foram selecionadas para a presença dos vetores mediante a adição de geneticina durante 3 semanas. Passado esse período, quando todas as células já devem possuir o plasmídeo, a concentração de geneticina foi reduzida à metade para manutenção. Para determinar a expressão do gene K^b, foi feita extração de RNA total com TRIZOL. Como é observado na Figura 22, o RNA isolado das três amostras apresenta duas bandas discretas predominantes, correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S. O contraste da foto não permite observar os RNA de alto e baixo peso molecular, correspondentes a mRNA e heterogêneo nuclear, e ao RNA de transferência e 5S, respectivamente.

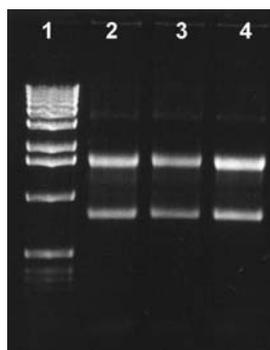
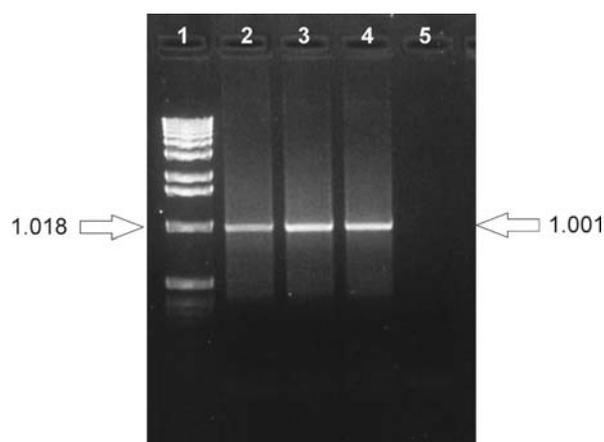


Figura 22. Produto da extração de RNA de células CHO em cultura. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); coluna 2: extração de RNA total a partir de CHO; coluna 3: produto da extração de RNA total a partir de CHO/pVP22K^b; coluna 4: produto da extração de RNA total a partir de CHO/pCIneoK^b.

O RNA total foi utilizado como molde para a transcrição reversa e PCR para a amplificação do gene de expressão ubíqua GAPDH e do transcrito K^b, amplificando as bandas esperadas de 1.001 (Figura 23a), e de 1.137 pb (Figura 23b), respectivamente.

a)



b)

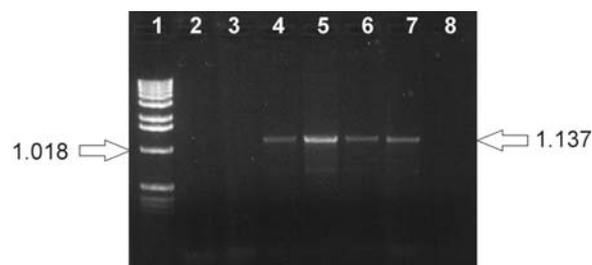
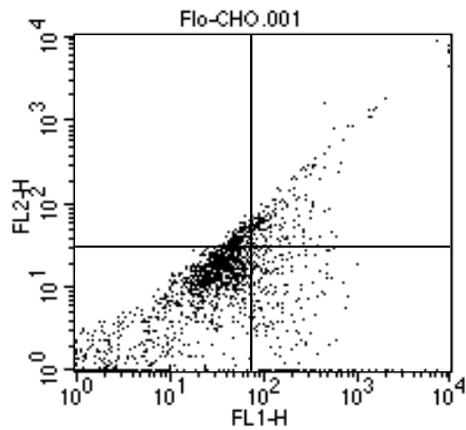


Figura 23. Produtos da transcrição reversa e PCR para os genes GAPDH e K^b com amostras de células transfectadas. Gel de agarose 1,5 % corado com EtBr e observado sob luz ultravioleta. a) Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); colunas 2, 3, 4: PCR para GAPDH a partir de cDNA de células CHO, CHO/pVP22K^b e CHO/pCIneoK^b, respectivamente, mostrando a banda de 1.001 pb correspondente ao gene da GAPDH; coluna 5: branco de reagentes. b) Coluna 1: marcador de peso molecular (1kb); colunas 2, 3: PCR para K^b a partir de cDNA de CHO; colunas 4, 5: PCR para K^b a partir de cDNA de CHO/pVP22K^b; coluna 6, 7: PCR para K^b a partir de cDNA de CHO/pCIneoK^b, mostrando a presença da banda de 1.137 pb correspondente ao gene K^b; coluna 8: mistura da reação.

Para confirmar a expressão do K^b, as células em cultura foram analisadas por citometria de fluxo usando um anticorpo específico anti-K^b. Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 24, 25 e 26. A figura 24, mostra a população de células CHO não transfectadas. Como observado na análise estatística dos quadrantes, existe uma pequena população positiva para a expressão do K^b (12,48 %). Da mesma forma, a

figura 25a) mostra a subpopulação de células CHO/pVP22K^b que expressa o K^b (17,33 %). Diferente do caso anterior, o perfil de expressão das células CHO/pCIneoK^b foi altamente positivo 94,89 % (Figura 25b). Porém, devido à baixa percentagem de células CHO/pVP22K^b com marcação positiva para o K^b, e tentando esclarecer se a união da proteína VP22 à proteína K^b mudaria a localização desta última expressa na superfície da célula, as células foram tratadas com uma solução permeabilizante para determinar se a proteína K^b estava sendo expressa no interior da célula. O resultado está representado na figura 26. Aqui, 92,21 % das células CHO/pVP22K^b mostraram expressão intracelular da proteína K^b, assim como também 97,68 % das células CHO transfectadas com o plasmídeo pCIneo::K^b.



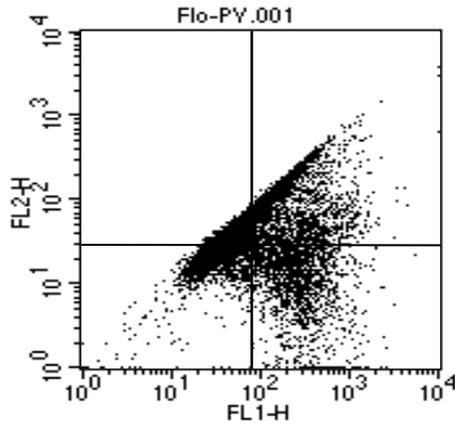
Quadrant Statistics

File: Flo-CHO.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: FloCHO Patient ID:
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 27-Aug-56 Gate: No Gate
 Gated Events: 1650 Total Events: 1650
 X Parameter: FL1-H (Log) Y Parameter: FL2-H (Log)
 Quad Location: 78, 28

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	157	9.52	9.52	55.90	54.71	38.88	37.91
UR	165	10.00	10.00	600.54	215.14	413.00	101.87
LL	1122	68.00	68.00	26.16	16.56	10.70	6.90
LR	206	12.48	12.48	345.97	196.11	8.90	5.03

Figura 24. Gráfico de pontos resultante da análise por citometria de fluxo da expressão da proteína K^b em células CHO em cultura não transfectadas. As células foram incubadas com anticorpo primário contra o K^b, e anticorpo secundário marcado com FITC. Embaixo os valores do quadrante estatístico.

a)



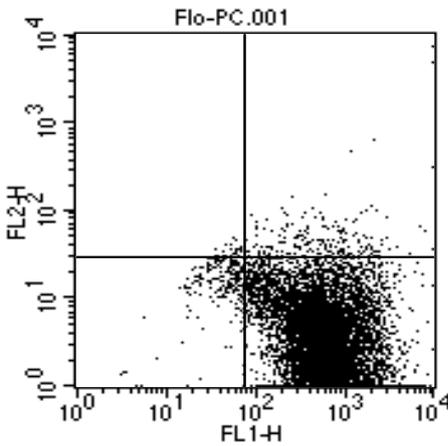
Quadrant Statistics

File: Flo-PV.001
 Sample ID: FloPV
 Tube:
 Acquisition Date: 27-Aug-56
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)
 Quad Location: 78, 28

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	3046	30.46	30.46	49.95	48.03	43.02	41.54
UR	2575	25.75	25.75	289.99	199.86	112.34	86.57
LL	2646	26.46	26.46	31.40	28.42	20.17	18.86
LR	1733	17.33	17.33	327.45	257.18	12.71	9.73

b)



Quadrant Statistics

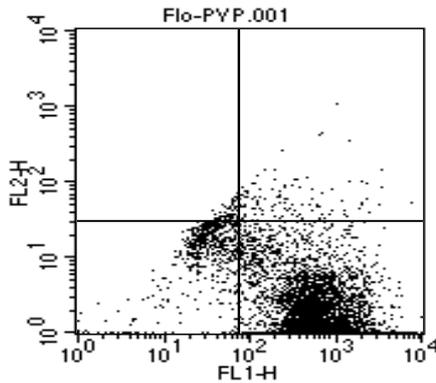
File: Flo-PC.001
 Sample ID: FloPC
 Tube:
 Acquisition Date: 27-Aug-56
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)
 Quad Location: 78, 28

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	36	0.36	0.36	54.40	52.49	33.52	33.13
UR	229	2.29	2.29	1081.20	577.31	136.22	47.30
LL	246	2.46	2.46	48.25	42.48	15.45	13.21
LR	9489	94.89	94.89	838.75	617.44	4.38	2.64

Figura 25. Gráfico de pontos resultante da análise por citometria de fluxo da expressão da proteína K^b em células CHO em cultura transfectadas com o plasmídeo pVP22 K^b e pCIneo K^b . As células CHO transfectadas, foram incubadas com anticorpo primário contra o K^b , e anticorpo secundário marcado com FITC. A direita os valores estatísticos dos quadrantes mostrados. a) células CHO transfectadas com o plasmídeo pVP22 K^b , b) células CHO transfectadas com o plasmídeo pCIneo K^b .

a)



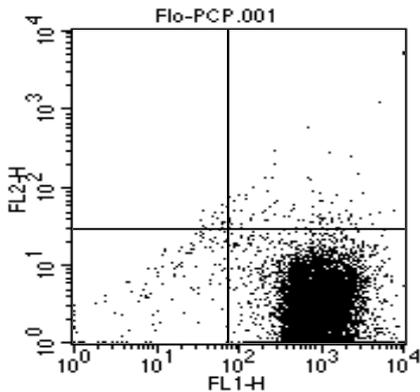
Quadrant Statistics

File: Flo-PVP.001
 Sample ID: FloPVP
 Tube:
 Acquisition Date: 27-Aug-56
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)
 Quad Location: 78, 28

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	88	0.88	0.88	55.99	54.49	38.79	37.57
UR	114	1.14	1.14	637.80	331.45	76.31	57.39
LL	577	5.77	5.77	36.19	28.54	13.05	9.57
LR	9221	92.21	92.21	887.22	665.98	1.89	1.36

b)



Quadrant Statistics

File: Flo-PCP.001
 Sample ID: FloPCP
 Tube:
 Acquisition Date: 27-Aug-56
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1-H (Log)
 Quad Location: 78, 28

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel:
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	20	0.20	0.20	58.89	57.05	40.16	38.94
UR	90	0.90	0.90	1506.09	763.81	247.93	63.60
LL	122	1.22	1.22	24.56	12.53	8.38	5.18
LR	9768	97.68	97.68	1022.59	827.93	3.31	2.31

Figura 26. Expressão intracelular da proteína K^b em células CHO em cultura transfectadas com os plasmídeos pVP22:: K^b e pCIneo K^b . As células transfectadas foram permeabilizadas e incubadas com anticorpo primário contra o K^b , e anticorpo secundário marcado com FITC. A direita os valores do quadrante estatístico mostrado. a) células CHO transfectadas com o plasmídeo pVP22 K^b , b) células CHO transfectadas com o plasmídeo pCIneo K^b .

Finalmente as células foram fixadas com formaldeído 1%, e permeabilizadas com metanol 100 % para verificar a expressão da proteína K^b por imunofluorescência indireta, como mostrado na figura 27.

5. DISCUSSÃO

Há quase cinquenta anos, pesquisadores do mundo inteiro dedicados à área de transplantes têm como objetivo a indução de tolerância imunológica, para evitar a rejeição e o emprego a longo prazo de drogas imunossupressoras. No entanto, apesar dos inúmeros esforços, a indução de tolerância ainda não foi atingida de forma consistente a nível clínico. Diversas abordagens utilizam uma combinação de drogas imunossupressoras, algumas vezes juntamente com anticorpos policlonais ou monoclonais e, embora essa estratégia seja eficaz a curto prazo, o uso das mesmas a longo prazo produz efeitos adversos, tais como, uma maior propensão a infecções causadas por microrganismos oportunistas e certas formas de câncer, que são certamente indesejáveis.

Atualmente, outras estratégias têm sido propostas, graças aos grandes avanços ocorridos na área da biologia molecular. Uma das mais atraentes, é a terapia gênica que, nos últimos anos tem se baseado no desenvolvimento de vetores de ácidos desoxirribonucléicos, onde o antígeno de interesse é sintetizado no citoplasma da célula hospedeira a partir de sua seqüência no cDNA (43). A imunização com ácidos nucleicos é especialmente atraente para o desenvolvimento de vacinas contra doenças causadas por vírus, parasitas, e patógenos intracelulares, onde os linfócitos T são mediadores chave tanto na proteção quanto nas patologias causadas por esses microrganismos (123). Os resultados surpreendentes desta técnica relativamente simples estão sendo explorados principalmente no desenvolvimento de novas vacinas, e resultados promissores já foram obtidos experimentalmente contra a influenza (124), o micoplasma (125), a hepatite B (126), o herpes simples (127) e a hepatite C (128).

Além disso, vetores utilizados em terapia gênica que codificam moléculas envolvidas no processo de reconhecimento da APC pelo linfócito T CD4 têm sido desenvolvidos como estratégia de indução de tolerância imunológica (48, 59, 62, 64, 66, 74, 76, 84).

Por serem altamente polimórficos, os produtos dos genes do complexo de histocompatibilidade principal participam tanto de forma direta como indireta no

processo de reconhecimento pelos linfócitos T CD4 e são os peptídeos principalmente reconhecidos no processo de rejeição. Por existir uma hierarquia entre os diferentes produtos expressos, escolhemos trabalhar com a molécula imunodominante do complexo de histocompatibilidade principal de classe I, H-2K^b (76).

Para a clonagem do gene K^b no plasmídeo pVP22/*myc*-His, partimos de um plasmídeo pBluescriptIISK::*K^b*, onde o gene havia sido previamente clonado. Como o pVP22/*myc*-His codifica para a seqüência do gene VP22, foi necessário incluir uma subclonagem intermediária utilizando o plasmídeo de expressão eucariótica pCIneo. Com este passo intermediário, asseguraríamos que o gene K^b fosse clonado seguindo a mesma pauta de leitura que o gene VP22. Porém, em todos os clones recombinantes pVP22::*K^b* analisadas, o gene K^b encontrava-se na orientação 3' → 5'. Não achamos nenhuma explicação satisfatória para tal resultado, visto que a probabilidade teórica de inserção em qualquer das duas orientações é de 50 %.

Devido à dificuldade na clonagem do gene K^b na orientação correta, optou-se pela obtenção do cDNA do gene do baço de um camundongo da linhagem C57BL/6 que apresenta o mesmo haplótipo que camundongos da linhagem C57BL/10 utilizada neste estudo (6). A linhagem C57BL/10 foi designada como o protótipo que expressa o haplótipo H-2^b. Qualquer uma dessas duas linhagens, expressa o complexo de histocompatibilidade principal de classe I, H-2K^b. Uma vez obtido esse produto, foram feitas duas transcrições reversas: uma usando-se uma coluna de oligo-dT e outra com o oligonucleotídeo específico reverso SKB2.

Dessa forma foram obtidos dois produtos ou cDNAs que permitiram escolher, de acordo com a melhor banda visualizada em gel de agarose, qual dos dois poderia ser utilizado para a clonagem posterior. A presença de um produto de PCR formado por uma banda única e nítida do tamanho esperado (1.137 pb) determinou a escolha pelo cDNA obtido com emprego do oligonucleotídeo específico reverso SKB2, na seqüência de experimentos, descartando o uso do cDNA obtido com a coluna de oligo-dT.

O plasmídeo pBluescriptIISK::*K^b* que também continha o gene que codifica para o K^b clonado, também foi empregado para amplificação pela PCR utilizando a

DNA polimerase *Pfx*. Esta enzima foi escolhida por ter uma atividade exonucleásica $3' \rightarrow 5'$, a qual diminui a probabilidade de introdução de mutações durante o processo de polimerização, quando comparada com as DNA polimerases rotineiramente usadas no diagnóstico (*Taq* DNA polimerase) que carecem desta atividade, e portanto não exibem alta fidelidade (129).

Uma vez obtidos os produtos denominados K^bA e K^bB , ambos foram clonados no plasmídeo comercial pCRBluntII-TOPO. Este vetor foi escolhido, pois permite a clonagem direta de produtos de PCR gerados com extremidades cegas e, portanto, dispensa o uso de oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de restrição para a clonagem. Outra característica deste vetor é que ele apresenta-se linearizado e unido de forma covalente à enzima topoisomerase I, do vírus da *Vaccinia*. Uma reação posterior de ataque nucleofílico entre a seqüência do vetor e o fragmento a ser clonado dispensa o uso da enzima ligase para a clonagem. Por último, o vetor apresenta a seqüência que codifica o gene letal *ccdB* (controle de morte celular) de *E. coli*. A clonagem do produto da PCR K^b , interrompe a expressão deste gene, permitindo o crescimento somente das colônias recombinantes (119). Como pode ser observado neste estudo, as 19 colônias que cresceram continham o inserto. Uma vez obtidos os clones recombinantes, esses foram seqüenciados automaticamente.

Toda a seqüência do segmento do cDNA do K^b foi analisada pelo seqüenciamento. O seqüenciamento automático apresenta algumas vantagens em relação ao seqüenciamento manual já que prescinde do uso de reagentes radioativos durante a manipulação, necessários para a detecção dos produtos, e a técnica pode ser realizada e o resultado obtido no mesmo dia.

A ausência de mutações em toda a seqüência K^b , permitiu a escolha do clone pCRBluntII:: K^bB7 dentre os 19 produzidos, que continha a cadeia α do complexo de histocompatibilidade principal de classe I K^b clonado. Assim, para as sub-clonagens foram utilizados dois plasmídeos diferentes, pVP22/*myc*-His (117) e pCIneo (113). Estes foram escolhidos por serem vetores de expressão para células de mamíferos, já que apresentam os elementos regulatórios promotor/*enhancer* de citomegalovírus humano que promove a expressão de forma constitutiva do cDNA clonado nessas

células. Além disso, ambos contêm outras seqüências necessárias para permitir a clonagem e expressão do gene de interesse ou do mRNA, como: o sítio de múltipla clonagem, o sítio de poliadenilação, a origem de replicação e genes de resistência a antibióticos, para a seleção dos clones recombinantes tanto em células eucarióticas (gene de resistência a neomicina) como procarióticas (gene de resistência a ampicilina).

O vetor comercial pVP22/*myc*-His apresenta o gene que codifica para a proteína VP22 do vírus herpes simples humano do tipo 1, que tem como propriedade o tráfego intercelular. Esta proteína já foi descrita como carreadora de outras proteínas como GFP, β -galactosidase ou p53 formando proteínas híbridas ou quiméricas (100, 101, 106, 107). Desta forma, embora este sistema não aumente o número de células atingidas no processo de transfecção com o vetor não viral, existe um maior número de células que podem ser beneficiadas da funcionalidade da proteína híbrida tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Como controle desta construção, foi empregado o plasmídeo pCIneo, amplamente utilizado para a expressão constitutiva de proteínas em células de mamíferos (130-132).

A estratégia de clonagem foi a mesma para ambos os vetores. O plasmídeo pCRBluntII::K^bB7 foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Nhe* I, que geram extremidades compatíveis (CTAG) e, após a purificação, foram clonados nos plasmídeos digeridos com *Xba* I e defosforilados para evitar sua recircularização ou a produção de produtos heterogêneos. Como a clonagem não foi direcionada, foi necessário fazer uma análise com a enzima de restrição *Kpn* I para identificar-se os clones com a correta orientação 5'→3', do inserto K^b. Assim, foram identificados três clones de pVP22::K^b que apresentaram o inserto na orientação correta, ao passo que apenas um clone de pCIneo::K^b apresentou o inserto nesta orientação. Para demonstrar a clonagem do gene K^b em ambos plasmídeos, o início e o fim do gene K^b foram seqüenciados com oligonucleotídeos iniciadores desenhados especificamente para os plasmídeos pVP22 e pCIneo, confirmando o início e o fim do gene K^b no plasmídeo pCIneo::K^b. Não foi possível obter um resultado confiável a partir do seqüenciamento do clone pVP22::K^b com o oligonucleotídeo específico direto pVP22. Porém, a

seqüência da extremidade 3' do inserto K^b foi seqüenciada, e as análises da clivagem com enzimas de restrição, mostram que o gene K^b também havia sido clonado no plasmídeo pVP22.

Objetivando contornar a possibilidade da ausência de modificações pós-traducionais que se traduzissem em uma conformação espacial incorreta da proteína, os clones seqüenciados correspondentes a cada plasmídeo pVP22 e pCIneo, foram escolhidos e utilizados para transfectar as células de ovário de hamster chinês, células CHO. A expressão estável do gene clonado nas células transfectadas em cultura foi assegurada pela seleção em meio contendo o antibiótico G-418. As células transfectadas com esses plasmídeos codificam para um gene denominado neomicina fosfotransferase, cujo produto, a enzima Aminoglicósido fosfotransferase, converte o antibiótico G-418 em um produto não tóxico, inibindo sua capacidade de se unir aos ribossomos celulares (133).

Como existia a possibilidade de que a proteína híbrida VP22 K^b tivesse uma base a mais entre ambos genes na clonagem com a enzima de restrição *Xba* I, que mudaria a pauta de leitura, foi feita uma extração de RNA total para ver expressão do mRNA do K^b , das células CHO/pVP22:: K^b , CHO/pCIneo:: K^b e CHO não transfectadas (controle). Após a extração do RNA total, o mesmo foi tratado com a enzima DNAase I que cliva ssDNA e dsDNA, transcrição reversa e PCR para o gene K^b . O tratamento com DNAase I é um cuidado necessário para evitar a possibilidade de falsos positivos devido à amplificação direta do DNA, ao invés de mRNA. Como controle da extração de RNA total nas amostras, também analisou-se a expressão constitutiva de enzima GAPDH.

Uma vez confirmada a presença do mRNA para a molécula K^b , a expressão da proteína K^b foi determinada por duas técnicas diferentes, pela citometria de fluxo e pela imunofluorescência. Na análise por citometria de fluxo, os dados estatísticos das células CHO transfectadas com o plasmídeo pCIneo:: K^b demonstraram uma forte expressão da proteína K^b , o que sugere a expressão da proteína na superfície da célula.

Por outro lado, nas células transfectadas com o plasmídeo pVP22:: K^b , quase não houve expressão da proteína K^b na sua superfície celular. O valor estatístico

obtido da expressão do K^b na superfície foi comparável ao controle negativo da população não transfectada. Esse valor foi surpreendentemente baixo. Como a proteína K^b , em nossa construção, deveria estar ligada à proteína VP22, formulamos a hipótese de que esta molécula híbrida interferiria na expressão da proteína K^b na superfície celular.

Assim, pesquisamos a expressão de K^b no compartimento intracelular, o citoplasma. Para isto, procedemos inicialmente à permeabilização das células, para depois tratá-las com anticorpo anti- K^b . Após tal abordagem, houve importante aumento da intensidade de fluorescência, evidenciando-se que o cDNA VP22:: K^b foi eficientemente transcrito e traduzido nessa construção. Entretanto, a expressão na superfície celular foi prejudicada, provavelmente por esta molécula K^b estar conjugada à proteína carreadora VP22.

Esse resultado está de acordo com dados da literatura, que indicam que as proteínas que são carregadas por VP22 têm uma localização final intracelular, tanto nuclear quanto citoplasmática (101, 103). As células CHO/pCIneo:: K^b permeabilizadas também demonstraram expressão intracelular da proteína K^b .

A segunda técnica para demonstrar a expressão da proteína K^b foi a de imunofluorescência indireta. Esta técnica baseia-se na detecção de moléculas expressas, após a interação entre um anticorpo específico dirigido contra esse antígeno (em nosso caso a molécula K^b) e um segundo anticorpo que tem a propriedade de reconhecer o anticorpo primário ligado ao antígeno. Este segundo anticorpo, denominado anticorpo secundário, encontra-se unido de forma covalente a uma molécula fluorescente, neste caso o isotiocianato de fluoresceína, mais comumente denominado de fluoresceína. Quando esta molécula é observada em um microscópio de fluorescência, e sobre ela incide luz do comprimento de onda adequada, o fluoróforo se excita e, ao voltar a seu estado energético basal, emite energia em forma de fluorescência.

Para determinar a expressão da proteína K^b , as linhagens celulares transfectadas CHO/pVP22:: K^b e CHO/pCIneo:: K^b juntamente com as células CHO não transfectadas foram analisadas. Como esperado, e confirmando os resultados de

expressão de K^b ao nível de mRNA e de proteína por análise por citometria de fluxo, foi possível observar imunofluorescência nas linhagens transfectadas (Figura 27).

Portanto, foi possível obter duas ferramentas moleculares, pVP22:: K^b e pCIneo:: K^b , contendo o gene clonado K^b . Tais moléculas foram eficientemente expressas sob forma de mRNA e de proteína quimérica, por células eucarióticas em cultura. Além disso o vetor não viral pVP22:: K^b contém a molécula K^b clonada na mesma pauta de leitura que a molécula VP22. Portanto uma nova proteína quimérica foi construída VP22- K^b , e expressa pelas células CHO em cultura.

Em estudos futuros, deveremos testar se esta proteína quimérica tem a propriedade de transportar a molécula K^b para outras células, *in vitro* e *in vivo*. Estes estudos preliminares deverão ser realizados para complementar o presente estudo. Trabalhos adicionais empregando modelos animais em transplante permitirão determinar se esta proteína quimérica é capaz de induzir tolerância em transplante e se essa nova ferramenta pode ser utilizada como estratégia alternativa para imunossupressão.

Entre os projetos futuros, dentro da mesma linha de pesquisa, deveremos elaborar uma molécula híbrida composta pela proteína VP22 e pelo cDNA da molécula K^b . Desta forma, este cDNA poderá ser transportado para as células alvo e é provável que sua expressão na forma de proteína de superfície K^b não seja prejudicada pela proteína VP22.

Este tipo de construção também nos oportunizará a elaboração de outras moléculas híbridas entre a proteína VP22 e cDNAs de interesse, as quais, poderiam abortar uma resposta imune.

6. CONCLUSÕES

Como base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

1. Foi possível realizar diversas construções do gene K^b em diferentes plasmídeos, tanto de clonagem, pCRBluntII-TOPO, quanto de expressão, pVP22/*myc*-His e pCIneo.
2. Células eucarióticas em cultura foram transfectadas com os plasmídeos pCIneo:: K^b ou pVP22:: K^b , e expressaram a proteína K^b .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. Clin Transpl 2000:1-18.
- 2.Fabre JW, Morris PJ. Experience with passive enhancement of renal allografts in A (DA x Lewis)F 1 to Lewis Strain combination. Transplantation 1972;13(6):604-9.
- 3.Morris PJ. Suppression of rejection of organ allografts by alloantibody. Immunol Rev 1980;49:93-125.
- 4.Bushell A, Wood KJ. Permanent survival of organ transplants without immunosuppression: Experimental approaches and possibilities for tolerance induction in clinical transplantation. Exp. Rev. Mol. Med. 29 October, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99001179h.htm>, 1999.
- 5.Krensky AM. The HLA system, antigen processing and presentation. Kidney Int Suppl 1997;58:S2-7.
- 6.Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Major histocompatibility complex. In: W.A.Freeman and company, editors. 4th. ed. Kuby immunology. New York; 2000. p.:173-99.
- 7.Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. Nature 1999;401(6756):921-3.
- 8.VanBuskirk AM, Pidwell DJ, Adams PW, Orosz CG. Transplantation immunology. Jama 1997;278(22):1993-9.
- 9.Silverstein AM, Rose NR. On the mystique of the immunological self. Immunol Rev 1997;159:197-206.
- 10.Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. Science 1945;102:400-1.
- 11.Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance for foreign cells. Nature 1953;172:603.

12. Trambley J, Pearson TC, Larsen CP. Interpreting murine tolerance experiments. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2000(5):103-107.
13. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. *Science* 1992;257(5073):1130-4.
14. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Trucco M, Thomson AW, Rao AS. The lost chord: microchimerism and allograft survival. *Immunol Today* 1996;17(12):577-84.
15. Wood K, Sachs DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996;17(12):584-7.
16. Nardo B, Valdivia LA, Catena F, Cavallari G, Demetris AJ, Rao AS, et al. Evidence of microchimerism after pretransplant blood transfusion and FK 506 in liver xenograft. *Transplant Proc* 2000;32(8):2710-2.
17. Ko S, Deiwick A, Jager MD, Dinkel A, Rohde F, Fischer R, et al. The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med* 1999;5(11):1292-7.
18. Exner BG, Acholonu IN, Bergheim M, Mueller YM, Ildstad ST. Mixed allogeneic chimerism to induce tolerance to solid organ and cellular grafts. *Acta Haematol* 1999;101(2):78-81.
19. Starzl TE, Murase N. Microchimerism, macrochimerism, and tolerance. *Clin Transplant* 2000;14(4 Pt 1):351-4.
20. Strober S, Dhillon M, Schubert M, Holm B, Engleman E, Benike C, et al. Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med* 1989;321(1):28-33.
21. Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* 1991;114(11):954-5.

22. Rosen FS, Geha RS. Graf-versus-host disease. In: Taylor and Francis group, editors. 3rd.ed. Case studies in immunology. A clinical companion. New York: Garland Publishing; 2001. p. 77-80.
23. Wekerle T, Kurtz J, Ito H, Ronquillo JV, Dong V, Zhao G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 2000;6(4):464-9.
24. Morris PJ. Progress in the induction of tolerance to allografts. *Transplant Proc* 1998;30(5):2427-9.
25. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;338(25):1813-21.
26. Danovitch G. Immunosuppressant-induced metabolic toxicities. *Transplantation Reviews* 2000;14(2):65-81.
27. Alegre M, Fallarino F, Zhou P, Frauwirth K, Thistlethwaite J, Newell K, et al. Transplantation and the CD28/CTLA4/B7 pathway. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):209-11.
28. Bashuda H, Seino K, Kano M, Sato K, Azuma M, Yagita H, et al. Specific acceptance of cardiac allografts after treatment with antibodies to CD80 and CD86 in mice. *Transplant Proc* 1996;28(2):1039-41.
29. Ossevoort MA, Ringers J, Boon L, Lorre K, van den Hout Y, Kuhn EM, et al. Blocking of costimulation prevents kidney graft rejection in rhesus monkeys. *Transplant Proc* 1998;30(5):2165-6.
30. Kato H, Onodera K, Chandraker A, Volk HD, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW. CD4-targeted therapy and CD28-B7 costimulatory blockage may independently induce tolerance in sensitized allograft recipients. *Transplant Proc* 1998;30(4):1063-4.
31. Subbotin V, Sun H, Chen C, Aitouche A, Valdivia L, Fung JJ, et al. Combined blockade of CD28/B7 and CD40/CD40L costimulatory pathways prevents the onset of chronic rejection. *Transplant Proc* 1998;30(4):941-2.

32. Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999;5(6):686-93.
33. Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance? *Curr Opin Immunol* 1999;11(5):497-503.
34. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259(5097):974-7.
35. Waldmann H, Cobbold SP. T-cell regulation and transplantation tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation* 200;5:83-89.
36. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001;166(5):3008-18.
37. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167(3):1245-53.
38. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18(6):263-6.
39. Zhou P, Szot G, Guo Z, Kim O, He G, Wang J, et al. Role of STAT6 signaling in the induction and long-term maintenance of tolerance mediated by CTLA4-Ig. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):214-6.
40. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 2000;6(6):686-8.
41. Platt JL. Genetic engineering for xenotransplantation. *Transplant Proc* 1999;31(3):1488-90.
42. Azevedo V, Levitus G, Miyoshi A, Candido AL, Goes AM, Oliveira SC. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(2):147-53.
43. Johnston SA, Barry MA. Genetic to genomic vaccination. *Vaccine* 1997;15(8):808-9.

44. Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 1998;19(2):89-97.
45. Dani SU. Terapia gênica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2000:28-33.
46. Fry JF, Wood KJ. Gene therapy: potential applications in clinical transplantation. *Exp. Rev. Mol. Med.* 8 June, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99000691h.htm>, 1999.
47. Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *Embo J* 1996;15(8):1766-77.
48. Zhang HG, Liu D, Heike Y, Yang P, Wang Z, Wang X, et al. Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells. *Nat Biotechnol* 1998;16(11):1045-9.
49. Roy S, Shirley PS, McClelland A, Kaleko M. Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon. *J Virol* 1998;72(8):6875-9.
50. Maione D, Della Rocca C, Giannetti P, D'Arrigo R, Liberatoscioli L, Franlin LL, et al. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):5986-91.
51. Sebestyén MG, Wolff JA. Nuclear transport of exogenous DNA. In: Huang L, Hung M-C, Wagner E, editors. *Nonviral vectors for gene therapy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 139-69.
52. Topp KS, Meade LB, LaVail JH. Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus. *J Neurosci* 1994;14(1):318-25.
53. Hollander GA, Zuklys S, Forster E, Krenger W. On costimulatory signals and T cell tolerance: relevance for transplantation immunity. *Transplant Proc* 1999;31(1-2A):25S-31S.

54. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15(7):321-31.
55. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174(3):561-9.
56. Reiser H, Stadecker MJ. Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. *N Engl J Med* 1996;335(18):1369-77.
57. Dai Z, Lakkis FG. The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection. *Curr Opin Immunol* 1999;11(5):504-8.
58. Liu C, Deng S, Yang Z, Kucher T, Guo F, Gelman A, et al. Local production of CTLA4-Ig by adenoviral-mediated gene transfer to the pancreas induces permanent allograft survival and donor-specific tolerance. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):625-6.
59. Liu C, Deng S, Jiang K, Gelman A, Shaked A, Brayman KL. Mechanism of adenoviral-mediated CTLA4-IG gene-induced pancreatic allograft tolerance in rats. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):134.
60. Liu C, Jiang K, Deng S, Gelman A, Shaked A, Brayman KL. Long-term localized transgene expression in the pancreas achieved by intra-arterial adenoassociated virus-mediated gene transfer. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):603.
61. Yang Z, Rostami S, Koeberlein B, Barker CF, Naji A. Cardiac allograft tolerance induced by intra-arterial infusion of recombinant adenoviral CTLA4Ig. *Transplantation* 1999;67(12):1517-23.
62. Echizenya H, Yamashita K, Takehara M, Konishi K, Nomura M, Yanagida N, et al. Adenovirus-mediated CTLA4-IgG gene therapy in orthotopic small intestinal transplantation in rats. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):183-4.
63. Yanagida N, Nomura M, Yamashita K, Takehara M, Murakami M, Echizenya H, et al. Tolerance induction by a single donor pretreatment with the adenovirus vector encoding CTLA4Ig gene in rat orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):573-4.

64. O'Rourke RW, Kang SM, Lower JA, Feng S, Ascher NL, Baekkeskov S, et al. A dendritic cell line genetically modified to express CTLA4-Ig as a means to prolong islet allograft survival. *Transplantation* 2000;69(7):1440-6.
65. Zamir G, Gelman AE, Debonera F, Hardwigsen J, Que X, Aldeguer X, et al. Modified AdCTLA-4 vector blocks alloimmune response in vitro. *J Surg Res* 2001;97(2):155-8.
66. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Konishi M, Echizenya H, et al. Novel CD40-IgG adenovirus-mediated gene therapy as a potent immunosuppressive treatment for liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):189.
67. Lu L, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 2002;73(1 Suppl):S19-22.
68. Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, et al. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol* 1999;162(9):5287-98.
69. Josien R, Muschen M, Gilbert E, Douillard P, Heslan JM, Soulillou JP, et al. Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 1998;66(7):887-93.
70. Oh SI, Kim IW, Jung HC, Seo JW, Chae IH, Kim HS, et al. Correlation of Fas and Fas ligand expression with rejection status of transplanted heart in human. *Transplantation* 2001;71(7):906-9.
71. Porter CJ, Ronan JE, Cassidy MJ. Fas-fas-ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 2000;69(6):1091-4.
72. Qin L, Chavin KD, Ding Y, Favaro JP, Woodward JE, Lin J, et al. Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation* 1995;59(6):809-16.

73. Qin L, Chavin KD, Ding Y, Tahara H, Favaro JP, Woodward JE, et al. Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J Immunol* 1996;156(6):2316-23.
74. DeBruyne LA, Li K, Chan SY, Qin L, Bishop DK, Bromberg JS. Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. *Gene Ther* 1998;5(8):1079-87.
75. Qin L, Ding Y, Pahud DR, Robson ND, Shaked A, Bromberg JS. Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther* 1997;8(11):1365-74.
76. Madsen JC, Superina RA, Wood KJ, Morris PJ. Immunological unresponsiveness induced by recipient cells transfected with donor MHC genes. *Nature* 1988;332(6160):161-4.
77. Saitovitch D, Bushell A, Morris PJ, Wood KJ. Modulation of the CD4 molecule is a major event in the induction of transplantation tolerance with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1159.
78. Saitovitch D, Roelen D, Morris PJ, Wood KJ. Differential immunodominance of individual MHC locus products: implications for the induction of immunologic tolerance to allografts. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1443.
79. Wong W, Fry J, Hyde K, Stranford S, Morris PJ, Wood KJ. Haematopoietic stem cells transduced with a single donor class I major histocompatibility complex gene can induce operational tolerance to fully allogeneic cardiac allografts. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):886.
80. Hayashi H, LeGuern C, Sachs DH, Sykes M. Long-term engraftment of precultured post-5-fluorouracil allogeneic marrow in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen: relevance for a gene therapy approach to tolerance induction. *Transpl Immunol* 1996;4(1):86-90.
81. Wong W, Stranford SA, Morris PJ, Wood KJ. Retroviral gene transfer of a donor class I MHC gene to recipient bone marrow cells induces tolerance to alloantigens in vivo. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1130.

82. Bagley J, Wu Y, Sachs DH, Iacomini J. Defining the requirements for peptide recognition in gene therapy- induced T cell tolerance. *J Immunol* 2000;165(9):4842-7.
83. Emery DW, Shafer GE, Karson EM, Sachs DH, LeGuern C. Retrovirus-mediated transfer and expression of an allogeneic major histocompatibility complex class II DRB cDNA in swine bone marrow cultures. *Blood* 1993;81(9):2460-5.
84. Emery DW, Sablinski T, Shimada H, Germana S, Gianello P, Foley A, et al. Expression of an allogeneic MHC DRB transgene, through retroviral transduction of bone marrow, induces specific reduction of alloreactivity. *Transplantation* 1997;64(10):1414-23.
85. Emery DW, Shimada H, Germana S, Sachs DH, LeGuern C. Transfer of porcine MHC DRalpha into IEalpha-deficient murine bone marrow results in reduced IE-restricted Vbeta usage. *Transplantation* 1998;66(8):1081-8.
86. Shimada H, Alexander RC, Germana S, Sachs DH, LeGuern C. Recombinant retrovirus vectors for the expression of MHC class II heterodimers. *Surg Today* 1999;29(6):533-41.
87. Shimada H, Germana S, Sonntag KC, Banerjee P, Moore D, Sachs DH, et al. MHC class II alpha/beta heterodimeric cell surface molecules expressed from a single proviral genome. *Hum Gene Ther* 1999;10(14):2397-405.
88. Sonntag KC, Haller GW, Giauffret D, Germana S, Reeves SA, Levy J, et al. Regulated expression of an MHC class II gene from a promoter-inducible retrovirus. *Hum Gene Ther* 2000;11(14):1961-9.
89. Sonntag KC, Emery DW, Yasumoto A, Haller G, Germana S, Sablinski T, et al. Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes. *J Clin Invest* 2001;107(1):65-71.
90. Robinson HL. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine* 1997;15(8):785-7.
91. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356(6365):152-4.

92. Xiang ZQ, Pasquini S, He Z, Deng H, Wang Y, Blaszczyk-Thurin MA, et al. Genetic vaccines--a revolution in vaccinology? *Springer Semin Immunopathol* 1997;19(2):257-68.
93. Zhai Y, Hong X, Wang J, Fechner JH, Goodman RE, Johnson MC, et al. Modulation of alloimmunity to major histocompatibility complex class I by cotransfer of cytokine genes in vivo. *Transplant Immunology* 1998;6:169-175.
94. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.
95. Corr M, von Damm A, Lee DJ, Tighe H. In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J Immunol* 1999;163(9):4721-7.
96. Prud'homme GJ, Lawson BR, Chang Y, Theofilopoulos AN. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. *Trends Immunol* 2001;22(3):149-55.
97. Felgner PL. Progress in gene delivery research and development. In: Huang L, Hung M-C, Wagner E, editors. *Nonviral vectors for gene therapy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 25-38.
98. Fillat C, Aran JM, Estivill X. Tools of gene transfer in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999;31(6):2230-1.
99. Elliott G, O'Reilly D, O'Hare P. Identification of phosphorylation sites within the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J Virol* 1999;73(7):6203-6.
100. Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997;88(2):223-33.
101. Elliott G, O'Hare P. Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J Virol* 2000;74(5):2131-41.
102. Kotsakis A, Pomeranz LE, Blouin A, Blaho JA. Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein. *J Virol* 2001;75(18):8697-711.

103. Pomeranz LE, Blaho JA. Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 1999;73(8):6769-81.
104. Wybranietz WA, Prinz F, Spiegel M, Schenk A, Bitzer M, Gregor M, et al. Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J Gene Med* 1999;1(4):265-74.
105. Derer W, Easwaran HP, Knopf CW, Leonhardt H, Cardoso MC. Direct protein transfer to terminally differentiated muscle cells. *J Mol Med* 1999;77(8):609-13.
106. Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther* 1999;6(1):149-51.
107. Aints A, Dilber MS, Smith CI. Intercellular spread of GFP-VP22. *J Gene Med* 1999;1(4):275-9.
108. Brewis N, Phelan A, Webb J, Drew J, Elliott G, O'Hare P. Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J Virol* 2000;74(2):1051-6.
109. Phelan A, Elliott G, O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol* 1998;16(5):440-3.
110. Liu CS, Kong B, Xia HH, Ellem KA, Wei MQ. VP22 enhanced intercellular trafficking of HSV thymidine kinase reduced the level of ganciclovir needed to cause suicide cell death. *J Gene Med* 2001;3(2):145-52.
111. Normand N, van Leeuwen H, O'Hare P. Particle formation by a conserved domain of the herpes simplex virus protein VP22 facilitating protein and nucleic acid delivery. *J Biol Chem* 2001;276(18):15042-50.
112. Wills KN, Atencio IA, Avanzini JB, Neuteboom S, Phelan A, Philopena J, et al. Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus. *J Virol* 2001;75(18):8733-41.
113. pCI-neo mammalian expression vector. Technical bulletin. Promega. Wisconsin.

114. Matrix gel extraction protocol. In: Matrix gel extraction systems. Life technologies. Producer of Gibco BRL products.
115. Barbas CF, Burton DR. Monoclonal antibodies from combinatorial libraries. In: Cold Spring Harbor Laboratory course; 1994, California.
116. Quick reference protocol. In: Strataprep Plasmid miniprep kit. Instruction manual, Stratagene.
117. pVP22/myc-His. Version A. Technical bulletin. Invitrogen, California.
118. TRIZOL Reagent. In: Instruction for RNA isolation. Life Technologies. Producer of Gibco BRL products.
119. Zero blunt TOPO PCR cloning kit. Version G. In: Instruction manual. Invitrogen.
120. DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit for MegaBACE. In: manual instructions. Amersham Pharmacia biotech
121. TRIZOL LS Reagent. In: Instruction for RNA isolation. Life Technologies. Producer of Gibco BRL products.
122. Mies B, Rottner K, Small JV. Multiple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. In: Celis, J.E., editors. 2nd. ed. Cell biology. A laboratory handbook. San Diego: Academic Press; 1998. Vol. II, p. 462-68.
123. Gomez-Chiarri M, Chiaverini LA. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genet Anal* 1999;15(3-5):121-4.
124. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259(5102):1745-9.
125. Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995;377(6550):632-5.

126. Michel ML, Davis HL, Schleef M, Mancini M, Tiollais P, Whalen RG. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5307-11.
127. Ghiasi H, Cai S, Slanina S, Nesburn AB, Wechsler SL. Vaccination of mice with herpes simplex virus type 1 glycoprotein D DNA produces low levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antiviral Res* 1995;28(2):147-57.
128. Lagging LM, Meyer K, Hoft D, Houghton M, Belshe RB, Ray R. Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1995;69(9):5859-63.
129. Pfx enzyme. In: Manual instruction. Life Technologies. Producer of Gibco BRL products.
130. Andley UP, Song Z, Wawrousek EF, Fleming TP, Bassnett S. Differential protective activity of alpha A- and alphaB-crystallin in lens epithelial cells. *J Biol Chem* 2000;275(47):36823-31.
131. Hurley MJ, Gerard DJ, Jauniaux E, Stern GM, Uchida K, Bradford HF. Cultured human foetal cerebral cortex, transfected with tyrosine hydroxylase cDNA, as a source of neural transplant material. *J Neural Transm* 2001;108(7):781-92.
132. Vanrompay D, Cox E, Kaiser P, Lawson S, Van Loock M, Volckaert G, et al. Protection of turkeys against *Chlamydophila psittaci* challenge by parenteral and mucosal inoculations and the effect of turkey interferon- gamma on genetic immunization. *Immunology* 2001;103(1):106-12.
133. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York;2001.

ANEXO A

Meios de cultura

1. LB (Luria Broth) líquido:

LB (Gibco)	20 g
NaCl	5 g
H ₂ O qsp	1000 ml
Autoclave	15 min a 121 °C

2. LB (Luria Agar) sólido:

LA (Gibco)	32 g
NaCl	5 g
Agar	3 g
H ₂ O qsp	1000 ml
Autoclave	15 min a 121 °C

3. Meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)

DMEM (Gibco)	49,9 g
NaHCO ₃	18,5 g
pH 7,2	
H ₂ O qsp	5000 ml
Esterilização por Filtração de 0,45 µm (Sartorius)	

Soluções

1. TAE 50x

Trisma base (Gibco)	242 g
Ácido acético glacial (Merck)	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
H ₂ O qsp	1000 ml

2. PBS 10x

Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
KCl	2,0 g
NaCl	80,0 g
H ₂ O qsp	1000 ml
pH 7,4	

3. TE 1x

Tris -Cl 100 mM (pH 8,0)	
EDTA 10 mM (pH 8,0)	0,6 ml
H ₂ O qsp	300 ml

Géis de Agarose

1. Gel de Agarose 1,5 %

Agarose (Gibco)	1,5 g
Brometo de Etídio (10 mg/ml, (Gibco)	8 µl
TAE 1x qsp	100 ml

Observações:

A água utilizada na preparação de todas as soluções e meios de cultura foi bi-destilada e submetida a osmose reversa no aparelho MilliQ, Millipore (H₂O Milli-Q).

Todas as soluções foram realizadas segundo Sambrook, J., e D. W. Russell. 2001.

ANEXO B

Apresentações do trabalho em congressos:

1. XX Congresso Brasileiro de Nefrologia. Natal, 2000. Apresentação Oral.
2. VII Congresso da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Vitória, 2001. Apresentação Oral.
3. 21ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, 2001. Apresentação de Pôster.
4. *World Transplantation Congress*. Miami, 2002. Apresentação Oral (a ser realizado em agosto de 2002).
5. Encontro Gaúcho de Imunologia. Porto Alegre, 2002. Apresentação Oral.

Publicações resultantes deste trabalho:

1. Vacina de DNA como ferramenta na indução de tolerância imunológica em transplante de órgãos. (Resumo). F.M. Barbé-Tuana, D.C. Machado, D. Saitovitch. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2000; 12(3): 30.
2. Construction of two DNA vaccines for the induction of immunological tolerance: cloning and mRNA expression in cell culture. F.M. Barbé-Tuana, D.C. Machado, D. Saitovitch. (*Abstract*) *Transplantation* (*in press*).

Terapia gênica em transplante de órgãos: estado atual e perspectivas futuras.
F.M. Barbé-Tuana, D.C. Machado, D. Saitovitch. *Atualidades em nefrologia* (*in press*).