**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

JULIO HENRIQUE KRAVCUKS ROZENFELD

**Arranjos supramoleculares de
oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada
catiônica: preparação, caracterização e atividade
imunoadjuvante**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/03/2011

JULIO HENRIQUE KRAVCUKS ROZENFELD

**Arranjos supramoleculares de
oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada
catiônica: preparação, caracterização e atividade
imunoadjuvante**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro

São Paulo
2011

Julio Henrique Kravcuks Rozenfeld

Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada catiônica: preparação, caracterização e atividade imunoadjuvante.

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A meus pais, Ester e Pawel,

pelo exemplo, apoio, paciência e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela orientação e oportunidade;

Ao Prof. Bayardo B. Torres, pela ajuda nos momentos de dificuldade;

À Débora Braga Vieira, que me abriu janelas quando portas fecharam;

À Profa. Iseli Nantes e ao Márcio Nardelli, pelo auxílio com os experimentos de CD;

À Profa. Dra. M. Teresa Lamy, ao Tiago Ribeiro e ao Evandro Duarte, pelo uso do calorímetro;

À Dra. Eliana Faquim-Mauro e às suas alunas Sandriana Ramos e Priscila Ranéia, pelo auxílio nos experimentos *in vivo*;

Ao Prof. Frank Quina e ao seu aluno Sérgio pelo uso do fluorímetro;

À Profa. Denise Petri e aos seus alunos Jorge e Rubens, pela presteza no empréstimo de reagentes;

Ao técnico Edson Gomes, pelo profissionalismo, dedicação e otimismo;

Ao Rodrigo Ribeiro e à Renata Palombo, pelo auxílio técnico;

Aos colegas de laboratório, Heloísa, Fabi, Vivi, Carol, Thiago, Lilian, Letícia, Camilla, Aniely, Evandro, Mariana e Bruna, pelo convívio proveitoso;

Aos meus mestres na UNICAMP: Adilson Leite-IB (*in memoriam*), Fernando Cerdeira-IFGW e Hiroshi Aoyama-IB, por ensinarem que ciência é uma mistura de prazer e resiliência;

À minha família em São Paulo, sobretudo à Babe Sara, que sempre me acolheu com coração aberto e prato cheio;

Aos colegas de IQ, Erich Tahara, Adriano Sartori, Camila Mano, Avishek Adhikari, Heberty Facundo, César Remuzgo, Fábio Dyszy e Foca (Arthur Nery), pelos momentos de riso e reflexão;

À Paola, à Claudinha e ao Max, pelo apoio moral (“É por nossas virtudes que somos bem punidos” – Nietzsche, 1886);

Aos funcionários do IQ, em especial aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação, que permitiram o bom desenvolvimento desse trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro.

“Não cabe a você encerrar o trabalho
nem você é livre para se isentar dele.
Não cabe a você completar a tarefa
nem você é livre para desistir dela.”

Pirkei Avot 2: 21

RESUMO

Rozenfeld, J.H.K. Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada catiônica: preparação, caracterização e atividade imunoadjuvante. 2011. 159p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A interação entre fragmentos de bicamada (BF) de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e um mononucleotídeo-modelo (deoxiadenosina monofosfato, dAMP) ou um oligodeoxinucleotídeo-modelo (5'-AAAAAAAAA-3', poli(dA)) ou um oligodeoxinucleotídeo terapêutico (5'-TTGACGTTTCG-3', CpG) foi investigada por turbidimetria, espalhamento de luz dinâmico, espectroscopia de dicroísmo circular e de fluorescência e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Respostas imunológicas foram caracterizadas com ensaio de hipersensibilidade tardia por inchamento de coxim patelar de camundongo, dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a e de citocinas secretadas por células de linfonodo em cultura.

Poli(dA), em contraste com dAMP, induziu fusão máxima de DODAB BF a partir da neutralização de cargas, quando houve obtenção de um tamanho máximo e um potencial-zeta igual a zero para os arranjos. Para [poli(dA)] maiores do que aquela correspondente à neutralização de cargas, houve recuperação da estabilidade coloidal com reversão do potencial-zeta e com obtenção de tamanhos que foram aproximadamente o dobro daqueles determinados inicialmente para DODAB BF. A proporção molar de neutralização poli(dA): DODAB foi 1:10 para DODAB BF e 1:20 para vesículas grandes (LV) de DODAB, de acordo com as estruturas de bicamada aberta e fechada dessas duas dispersões de bicamada de DODAB. A fusão de DODAB BF induzida por poli(dA) foi extensiva aumentando o grau de empacotamento das bicamadas formadas conforme inferido a partir dos termogramas de DSC. Em condições de equivalência de cargas, nucleotídeo não causou fusão de DODAB BF, mostrando a importância do caráter de polieletrólito do poli(dA) para induzir fusão. O sal divalente Na_2HPO_4 causou fusão e aumentou o empacotamento da bicamada graças à blindagem eficiente de cargas. Reestabilização coloidal como aquela induzida por poli(dA) não ocorreu em presença de Na_2HPO_4 , NaCl ou nucleotídeo.

Para complexos DODAB BF/CpG em presença de ovalbumina (OVA) como antígeno-modelo, a neutralização de cargas de DODAB BF/OVA por CpG reduziu a estabilidade coloidal, enquanto que supercompensação de cargas levou à reestabilização por repulsão eletrostática, como observado para a interação DODAB BF/poli(dA). Diferenças no tamanho e nas proporções de neutralização por CpG indicaram que os fragmentos são capazes de carregar mais moléculas de OVA do que de BSA. Na região de supercompensação de cargas com potenciais-zeta negativos, arranjos $\text{Al}(\text{OH})_3$ /OVA/CpG são coloidalmente bem mais instáveis que DODAB BF/OVA ou DODAB BF/OVA/CpG.

O complexo negativamente carregado DODAB (0,1 mM) / OVA (0,1 mg/mL) / CpG (0,020 mM) potencializou a resposta Th1 obtida com DODAB (0,1 mM) / OVA (0,1 mg/mL). Houve um aumento de 25 % no inchamento do coxim patelar, de 36 % na produção de $\text{IFN-}\gamma$, de 60 % de IL-12 e produção sustentada de IgG2a ao longo de 35 dias pós-imunização, todos indícios fortes de potencialização da resposta Th1 por CpG. Arranjos negativamente carregados de oligonucleotídeos em fragmentos de bicamada de DODAB possuem excelente potencial para terapias baseadas em oligonucleotídeos e para produção de vacinas para diferentes antígenos de interesse.

Palavras-chave: brometo de dioctadecildimetilamônio; oligonucleotídeo; CpG; imunoadjuvante; supercompensação de cargas; terapias baseadas em oligonucleotídeos

ABSTRACT

Rozenfeld, J.H.K. Supramolecular assemblies of oligodeoxynucleotides and cationic bilayer fragments: preparation, characterization and immunoadjuvant activity. 2011. 159p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The interaction between bilayer fragments (BF) of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and a model nucleotide (deoxyadenosine monophosphate, dAMP) or a model oligodeoxynucleotide (5'- AAAAAAAAAA-3', poly(dA)) or a therapeutic oligodeoxynucleotide (5'- TTGACGTTTCG -3', CpG) was investigated by means of turbidimetry, dynamic light scattering, circular dichroism and fluorescence spectroscopies and differential scanning calorimetry. Immune responses were characterized using footpad swelling delayed type hypersensitivity assay and antibody and cytokine measurements.

In contrast to dAMP, poly(dA) induced maximal DODAB BF fusion from charge neutralization, where assemblies presented maximal size and zero zeta-potential. Above charge neutralization colloid stability was recovered with negative zeta-potentials and sizes that were about the double of those initially determined for DODAB BF. The poly(dA):DODAB molar ratio for neutralization was 1:10 for DODAB BF and 1:20 for DODAB LV, in agreement with the open and closed bilayer structures of these two DODAB bilayer dispersions. The poly(dA)-induced DODAB BF fusion was extensive and increased the packing of the formed bilayers, as inferred from DSC thermograms. In conditions of charge equivalence, nucleotide did not cause DODAB BF fusion, highlighting the importance of poly(dA)'s polyelectrolyte character to induce fusion. Divalent Na₂HPO₄ salt caused fusion and increased bilayer packing due to efficient BF charge shielding. Colloid restabilization as induced by poly(dA) was not observed in presence of Na₂HPO₄, NaCl and nucleotide.

For DODAB BF/CpG complexes in presence of the ovalbumin (OVA) model antigen, the charge neutralization of DODAB BF/OVA by CpG reduced colloid stability, while charge overcompensation led to restabilization due to electrostatic repulsion, as observed for DODAB BF/poly(dA) interaction. Differences in size and neutralization proportions by CpG indicate that BF are able to load more OVA than BSA molecules. In the charge overcompensation region with negative zeta-potentials, Al(OH)₃/OVA/CpG assemblies are colloidally less stable than DODAB BF/OVA or DODAB BF/OVA/CpG.

The negatively charged DODAB (0.1mM)/OVA (0.1mg/ml)/CpG (0.020mM) assembly enhanced the Th1 response obtained with DODAB (0.1mM)/OVA (0.1mg/ml). There was a 25% increase in footpad swelling, a 36% and 60% increase in the production of IFN- γ and IL-12 and sustained IgG2a production for the 35-day period after immunization, all indicative of strong Th1 response enhancement by CpG. Negatively charged assemblies of oligonucleotides in DODAB bilayer fragments have excellent potential in oligonucleotide-based therapies and in vaccine production for different antigens of interest.

Key words: dioctadecyldimethylammonium bromide; oligonucleotide; CpG; adjuvant; charge overcompensation; oligonucleotide-based therapies

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ODN	oligodeoxinucleotídeo
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	receptores de reconhecimento de padrão
TLR	receptor <i>Toll-like</i>
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
TCR	receptor de célula T
CTL	linfócito T citotóxico
APC	célula apresentadora de antígeno
Th	linfócito T auxiliador
DC	célula dendrítica
IL	interleucina
IFN	interferon
Ig	imunoglobulina
NK	células “natural killer”
DNA	ácido desoxirribonucleico
DODAB	brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAB BF	fragmentos de bicamada de DODAB
DODAB LV	vesículas grandes de DODAB
Dz	diâmetro hidrodinâmico médio
P	polidispersidade
ζ	potencial-zeta
dAMP	nucleotídeo 2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato de sódio
poli(dA)	oligodeoxinucleotídeo 5'-AAAAAAAAAA-3'
CpG	oligodeoxinucleotídeo 5'-TTGACGTTCG-3'

DSC	calorimetria diferencial de varredura
T_m	temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina
ΔH	entalpia de transição de fase gel para líquido-cristalina
DLS	espalhamento de luz dinâmico
PyPC	2-(10-(1-pireno)-decanoil)-fosfatidilcolina
E/M	razão de fluorescência do excímero para o monômero
CD	espectroscopia de dicroísmo circular
BSA	albumina de soro bovino
OVA	ovalbumina
Al(OH)₃	hidróxido de alumínio
DTH	hipersensibilidade de tipo tardio
OD	densidade óptica
ELISA	ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
DOPE	dioleoilfosfatidiletanolamina
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Receptores *Toll-like* (TLRs), sua localização e seus ligantes (adaptado de Moser e Leo, 2010; Romagne, 2009). *página 29*

Tabela 2 – Adjuvantes testados em humanos (adaptado de O'Hagan e DeGregorio, 2009; Mbow et al., 2010). *página 38*

Tabela 3 - Esquema de imunização dos camundongos. *página 60*

Tabela 4 – Efeito de Na_2HPO_4 , dAMP e poli(dA) sobre as temperaturas de transição de fase (T_m) e as entalpias de transição (ΔH) de dispersões de 2mM DODAB preparadas em água. s.d. é o desvio padrão da média. *página 83*

Tabela 5- pH e concentração de cargas negativas para soluções aquosas de Na_2HPO_4 e de dAMP. *página 90*

Tabela 6 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB em presença de NaCl, Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA). δ é o erro padrão das medidas. *página 94*

Tabela 7 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB e para complexos entre fragmentos de bicamada de DODAB, OVA e CpG preparados em 1mM NaCl após 1 hora de interação. δ é o erro padrão das medidas. *página 111*

Tabela 8 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB e para complexos entre fragmentos de bicamada de DODAB, BSA e CpG preparados em 1mM NaCl após 1 hora de interação. δ é o erro padrão das medidas. *página 115*

Tabela 9 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para $\text{Al}(\text{OH})_3$ e para complexos $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/\text{CpG}$ em 1mM NaCl. δ é o erro padrão das medidas. *página 119*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de oligodeoxinucleotídeos com a estrutura nativa de ligações fosfodiéster e com estruturas modificadas. *página 20*

Figura 2- Representação esquemática das estruturas de fase de lipídios em função de sua geometria (adaptado de Wasungu e Hoekstra, 2006). *página 21*

Figura 3- Estrutura química da molécula de DODAB (A); bicamada fechada (DODAB LV) formada por vortexação acima da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina – T_m (B); e fragmentos de bicamada obtidos por sonicação com tip também acima da T_m (C). *página 25*

Figura 4- Esquema de captura e apresentação de antígenos por células dendríticas (DCs): **A-** Antígenos (Ags) são capturados por DCs nos tecidos periféricos e processados para formar complexos peptídeos-MHC. DCs reconhecem antígenos diretamente através de receptores de reconhecimento de sinais (PRRs) ou indiretamente através de células do estroma. O reconhecimento do antígeno ativa DCs, que migram para órgãos linfóides, onde estimulam linfócitos T auxiliares (Th) e citotóxicos (CTLs) a migrar para o foco de infecção para eliminar os patógenos e/ou células infectadas. Células B ativadas por Th diferenciam-se em células plasmáticas que produzem anticorpos (Igs) contra o patógeno. Citocinas secretadas por DCs também ativam células da imunidade inata. **B-** Nos órgãos linfóides, os antígenos apresentados por MHC em DCs são reconhecidos por receptores de linfócitos T (TCR). DCs secretam citocinas e exibem moléculas co-estimuladoras que ativam os linfócitos T. As moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80/86, por exemplo, são reconhecidas nos linfócitos por CD40L e CD28, respectivamente (adaptado de O'Hagan e Valiante, 2003). *página 32*

Figura 5- Esquema da indução e regulação de células Th1 e Th2. A célula precursora Th pode se diferenciar em células Th1 ou Th2 dependendo das citocinas presentes no micro-ambiente. Interleucina (IL)-12 estimula células Th1, enquanto IL-4 promove células Th2. As citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 podem agir como fatores autócrinos de crescimento e também como fatores inibitórios para o grupo oposto. Th1 intensifica a síntese de IgG2a por células B através de interferon- γ (IFN- γ), enquanto Th2 induz a produção de IgE e de IgG1 através de IL-4. A função de Th1 é mediar a destruição de patógenos intracelulares. Th2 combate helmintos e aumenta reações alérgicas. NK é célula “natural killer” (adaptado de Liew, 2002). *página 34*

Figura 6- Mecanismo de ação de DNA CpG em células dendríticas (DCs). Moléculas de DNA contendo seqüências-motivo CpG são capturadas por endocitose e direcionadas ao endossomo, onde ficam expostas ao TLR9. A ativação de TLR9 por CpG desencadeia vias de sinalização que desembocam na ativação do fator de transcrição NF- κ B, resultando na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras. Esses mensageiros químicos ativam células do sistema imune inato (como monócitos, neutrófilos e células “natural killer” - NK) e células T, resultando em resposta adaptativa do tipo Th1. *página 40*

Figura 7- Cinéticas de turbidez em 300 nm para 0,5 mM fragmentos de bicamada de DODAB em presença de Na₂HPO₄ (A), dAMP (B) ou poli(dA) (C). Concentrações de

Na₂HPO₄ e dAMP em (A) e (B) são, respectivamente, 0,05 (■); 0,1 (○); 0,25 (▲); 0,5 (▽); 1 (◆); e 2,5mM (◁). Em (C), concentrações de poli(dA) são 0,005 (■); 0,01 (○); 0,025 (▲); 0,05 (▽); 0,1 (◆); 0,25 (◁) e 0,5mM (►). Brancos são 0,5 mM DODAB BF. *página 66*

Figura 8- Efeito das concentrações de Na₂HPO₄, dAMP e poli(dA) sobre o diâmetro médio (A, B, C) e o potencial-zeta (D, E, F) de 0,5 mM DODAB BF. As concentrações de Na₂HPO₄ e dAMP são 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2,5 mM. As concentrações de poli(dA) são 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,175 e 0,25 mM. *página 67*

Figura 9- Efeito da concentração de poli(dA) sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) de 0,2 mM vesículas grandes de DODAB. As concentrações de poli(dA) são 0,002; 0,004; 0,006; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mM. *página 70*

Figura 10- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5mM (B) ou 2,5mM Na₂HPO₄ (C). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 72*

Figura 11- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5 mM (B) ou 2,5mM dAMP (C). Os números dentro dos gráficos correspondem ao pico mais intenso de cada distribuição. *página 73*

Figura 12- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,05 mM (B) ou 0,25 mM poli(dA) (C). Os números dentro dos gráficos correspondem ao pico mais intenso de cada distribuição. *página 74*

Figura 13- Distribuições de tamanho para 0,2mM DODAB LV em água (A) ou em presença de 0,01mM (B) ou 0,05mM poli(dA) (C). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 75*

Figura 14- Razão excímero-monômero (E/M) de PyPC em DODAB BF (marcado/não-marcado = 1:10) em função do tempo antes (■) e depois (□) da diluição de 10 vezes. DODAB BF marcado continha 7 mol % PyPC. Razão E/M corresponde à razão de emissão de fluorescência em 470nm / 395nm. *página 76*

Figura 15- Efeito da concentração de Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA) sobre os espectros de fluorescência de PyPC em fragmentos de bicamada de DODAB (A, C, E) ou sobre a razão excímero-monômero (B, D, F). O comprimento de onda de excitação era de 344nm. A concentração final de DODAB era 0,05 mM. DODAB BF marcados continham 7 mol % de PyPC. DODAB BF marcados e não marcados foram misturados na proporção 1:10. Após interagirem por 20 minutos com Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA), as dispersões foram diluídas 10 vezes para aquisição dos espectros. A razão excímero-monômero (E/M) corresponde à razão de intensidades de fluorescência em 470 nm / 395 nm. *página 78*

Figura 16- Efeito da concentração de poli(dA) sobre os espectros de fluorescência de PyPC em vesículas grandes de DODAB (A) e sobre a razão excímero-monômero (B). O comprimento de onda de excitação era de 344nm. A concentração final de DODAB era 0,02 mM. DODAB LV marcadas continham 7 mol % de PyPC. DODAB LV marcadas e não marcadas foram misturadas na proporção 1:10. Após interagirem por 20 minutos com poli(dA), as dispersões foram diluídas 10 vezes para aquisição dos espectros. A razão

excímero-monômero (E/M) corresponde à razão de intensidades de fluorescência em 470 nm / 395 nm. *página 80*

Figura 17- Termogramas de dispersões de 2 mM DODAB. Fragmentos de bicamada ou vesículas grandes de DODAB em água pura (A); fragmentos de bicamada em presença de 2 mM (B) ou 4 mM Na₂HPO₄ (C) e fragmentos de bicamada ou vesículas grandes em presença de 4 mM Na₂HPO₄ (D). *página 81*

Figura 18- Termogramas de 2 mM fragmentos de bicamada de DODAB em presença de 2 mM dAMP (A); 4 mM dAMP (B); 0,04 mM poli(dA) (C) ou 1 mM poli(dA) (D). *página 85*

Figura 19- Termogramas de 0,7 mM vesículas grandes de DODAB em água pura ou em presença de 0,27 mM poli(dA). *página 87*

Figura 20- Esquema de ionização dos ânions fosfato de Na₂HPO₄ (A) e dAMP (B). Os valores de pKa para os grupos fosfato de Na₂HPO₄ e dAMP foram obtidos em Kotz e Treichel, 1999 e em Mucha *et al.*, 2008, respectivamente. *página 88*

Figura 21- pH (A) e concentração de carga negativa (B) em soluções aquosas de dAMP (○) e de Na₂HPO₄ (□) em função da concentração de eletrólito adicionado. *página 89*

Figura 22- Cinéticas de turbidez em 300 nm para 0,5 mM DODAB BF em presença de NaCl. As concentrações de NaCl são 0,5 (■); 1 (○); 5 (▲); 10 (▽); 20 (◆); 40 (◁); 50 (►) e 100mM (□). O branco é 0,5 mM DODAB BF. *página 91*

Figura 23- Efeito da concentração de NaCl sobre o diâmetro médio (A e B) e o potencial-zeta (C) de 0,5 mM fragmentos de bicamada de DODAB. Em (B) estão detalhados os diâmetros médios para a faixa de concentração de 0 – 5 mM NaCl. *página 93*

Figura 24- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5mM (B), 5mM (C) ou 100mM NaCl. Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 96*

Figura 25- Termogramas de 2 mM DODAB BF em presença de 2 mM (A) ou 100 mM NaCl (B). *página 98*

Figura 26- Efeito de fragmentos de bicamada de DODAB sobre espectros de turbidez em 300nm (A) e de dicroísmo circular (B) de 0,05mM poli(dA). Em (A), as concentrações de fragmento são 0,1 (■); 0,2 (○); 0,3 (△); 0,5 (▽); 1 (◆); 2,5 (◁); 4 (►) e 5mM (□). Em (B), espectros de 0,05mM poli(dA) foram obtidos em água (—) ou em 0,1 (■); 0,2 (○) e 0,3mM (△) fragmentos de bicamada de DODAB. *página 101*

Figura 27- Efeito da concentração de DODAB BF sobre a estabilidade coloidal de soluções de 0,1mg/mL OVA. Diâmetros médios em função do tempo na presença de 0,005 (■); 0,01 (○); 0,02 (▲); 0,05 (▽); 0,1 (◆); 0,2 (□); 0,5 (●) e 1mM DODAB BF (△) são mostrados em (A) e detalhados para as concentrações maiores de DODAB BF em (B). Potenciais-zeta dos complexos DODAB BF / OVA após 1 hora de interação são mostrados em (C). Complexos preparados em 1mM NaCl. *página 104*

Figura 28- Distribuições de tamanho para 0,1 mg/mL OVA em presença de 0,005 (A), 0,05 (B), 0,1 (C) e 1mM DODAB BF (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 105*

Figura 29- Efeito de CpG sobre a estabilidade coloidal de complexos DODAB BF/ OVA preparados em 1mM NaCl. Os diâmetros médios dos complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA são mostrados em função do tempo em presença de 1 (■), 2 (○), 5 (▲), 10 (▽), 20 (◆), 50 (◁) e 100 μM CpG (▷) em (A) e detalhados para as concentrações maiores de CpG em (B). *página 107*

Figura 30- Efeito da concentração de CpG sobre os diâmetros médios (A) e os potenciais-zeta (B) de complexos DODAB BF / OVA após 1 hora de interação. Os complexos foram preparados em 1mM NaCl e as concentrações finais de DODAB BF e de OVA são 0,1mM e 0,1mg/mL, respectivamente. *página 109*

Figura 31- Distribuições de tamanho para 0,1mM DODAB BF (A), para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA (B) e para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA na presença de 1μM (C) ou 20μM CpG (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 110*

Figura 32- Efeito de tempo e de concentração de oligodeoxinucleotídeo CpG sobre o diâmetro de complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em 1mM NaCl. Diâmetros de 0,1mM DODAB BF (■); 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA (○) e 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em presença de 1 (▲), 2 (▽) e 5μM CpG (◆) são mostrados em (A). Diâmetros de 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em presença 10 (□), 20 (●), 50 (△) e 100 μM CpG (▼) são mostrados em (B). *página 113*

Figura 33- Efeito da concentração de CpG sobre os diâmetros médios (A) e os potenciais-zeta (B) de complexos DODAB BF / BSA após 1 hora de interação. Os complexos foram preparados em 1mM NaCl e as concentrações finais de DODAB BF e de BSA são 0,1mM e 0,1mg/mL, respectivamente. *página 114*

Figura 34- Distribuições de tamanho para 0,1mM DODAB BF (A), para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA (B) e para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA na presença de 1μM (C) ou 20μM CpG (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. Complexos preparados em 1mM NaCl. *página 116*

Figura 35- Distribuições de tamanhos de 0,1 mg/mL Al(OH)_3 (A), de complexos entre 0,1 mg/mL Al(OH)_3 e 1μM (B) ou 20μM CpG (C), de complexos entre 0,1 mg/mL Al(OH)_3 e 0,1 mg/mL OVA (D) e de complexos entre 0,1 mg/mL Al(OH)_3 e 0,1 mg/mL OVA na presença de 1μM (E) ou 20μM CpG (F). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. *página 121*

Figura 36- Reação de hipersensibilidade tardia em camundongos imunizados subcutaneamente com OVA em diferentes preparações de adjuvantes é expressa como aumento de espessura de pata (nm) ± erro padrão da média. Camundongos foram desafiados 5 dias após a imunização com 60μg OVA agregada e testados para hipersensibilidade 24 horas depois. Camundongos não-imunizados (naive) foram desafiados da mesma forma para testar inchamento inespecífico. Concentrações finais são 0,1mg/mL para OVA e Al(OH)_3 e 0,1mM

para DODAB BF. * $p < 0.05$ comparado com naive; # $p < 0.05$ comparado com OVA + Al(OH)₃; Δ $p < 0.05$ comparado com OVA + DODAB + CpG 20μM. *página 123*

Figura 37- Produção de anticorpos anti-OVA com isotipos IgG1 (A,B) e IgG2a (C,D) em função do tempo para camundongos imunizados com OVA em diferentes formulações dos adjuvantes DODAB, CpG ou Al(OH)₃. Concentrações finais são 1μM (A,C) ou 20μM CpG (B,D); 0,1mg/mL OVA; 0,1mg/mL Al(OH)₃ e 0,1mM DODAB BF. A quantificação de anticorpos do soro foi feita através de ELISA e expressa como a densidade óptica (OD) média ± desvio padrão de 5 animais/grupo. A quantificação em camundongos naive serve para detectar anticorpos não específicos para OVA. * $p < 0.05$ comparado com naive; # $p < 0.05$ comparado com OVA + Al(OH)₃; Δ $p < 0.05$ comparado com OVA + DODAB + CpG. *página 125*

Figura 38- Citocinas secretadas por células de linfonodos de camundongos imunizados com OVA em diferentes formulações. Células de linfonodos de camundongos BALB/c imunizados com 20μg OVA em 1mM NaCl ou em presença dos adjuvantes DODAB, CpG ou Al(OH)₃ foram estimuladas *in vitro* com meio, 250μg/mL OVA ou 2,5μg/mL ConA por 48 horas. Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) foram determinados através de ELISA “sanduíche”. Os resultados são expressos como a média das concentrações de citocinas (ng/ml) para dois ensaios diferentes ± desvio padrão da média. A linha tracejada vermelha representa o limite de detecção. Concentrações finais de adjuvantes são 0,1mg/mL Al(OH)₃, 0,1mM DODAB BF e 1μM ou 20μM CpG. * $p < 0.05$ comparado com OVA + Al(OH)₃; # $p < 0.05$ comparado com OVA + DODAB + CpG 1μM; Δ $p < 0.05$ comparado com OVA + DODAB + CpG 20μM. *página 128*

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	18
1.1- OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES.....	18
1.2- BICAMADAS CATIÔNICAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES.....	20
1.3- ARRANJOS SUPRAMOLECULARES DE OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS E BICAMADAS CATIÔNICAS.....	22
1.4- BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO E SUAS APLICAÇÕES.....	24
1.5- RESPOSTAS IMUNES INATA E ADAPTATIVA.....	27
1.6- VACINAS E ADJUVANTES.....	35
1.7- CpG COMO ADJUVANTE.....	39
2- OBJETIVOS	43
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1- MATERIAIS E REAGENTES	44
3.2- EQUIPAMENTOS	45
3.3- MÉTODOS	47
3.3.1- PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUE DE NUCLEOTÍDEO E OLIGODEOXINUCLEOTÍDEO.....	47
3.3.2- PREPARO DE DISPERSÕES DE BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO (DODAB)...	48
3.3.3- DETERMINAÇÃO DE TRANSIÇÃO DE FASE DE BICAMADAS DE DODAB POR DSC.....	49
3.3.4- DETERMINAÇÃO DE EFEITO DE ELETRÓLITOS SOBRE TURBIDEZ DE DODAB BF.....	51
3.3.5- DETERMINAÇÃO DE EFEITO DE ELETRÓLITOS SOBRE TAMANHO E POTENCIAL-ZETA DE DISPERSÕES DE DODAB.....	51
3.3.6- DETERMINAÇÃO DE FUSÃO DE BICAMADAS DE DODAB INDUZIDA POR ELETRÓLITOS..	54
3.3.7- DETERMINAÇÃO DE ESPECTROS DE CD DE POLI(DA) EM PRESENÇA DE DODAB BF.....	55
3.3.8- DETERMINAÇÃO DE CARGA NEGATIVA PARA Na_2HPO_4 E DAMP POR POTENCIOMETRIA	56
3.3.9- PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES-ESTOQUE DE DODAB BF, BSA E OVA.....	57
3.3.10- DETERMINAÇÃO DE DZ, ζ E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE DODAB BF/OVA/CpG	58
3.3.11- DETERMINAÇÃO DE DZ, ζ E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE DODAB BF/BSA/CpG	58
3.3.12- DETERMINAÇÃO DE DZ, ζ E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE $\text{Al}(\text{OH})_3$ /OVA/CpG.....	59
3.3.13- DESCRIÇÃO DO ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO.....	59
3.3.14- DETERMINAÇÃO DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA POR INCHAMENTO DO COXIM PATELAR.....	61
3.3.15- DETERMINAÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL (IgG1 e IgG2A) OVA-ESPECÍFICA.....	61
3.3.16- DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS (IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-13) SECRETADAS POR CÉLULAS DE LINFONODO EM CULTURA.....	63
3.3.17- ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SIGNIFICÂNCIA DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS.....	64
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1- EFEITO DE Na_2HPO_4 , DAMP OU POLI(DA) SOBRE A ESTABILIDADE COLOIDAL DE FRAGMENTOS DE BICAMADA DE DODAB	65
4.2- EFEITO DE Na_2HPO_4 , DAMP OU POLI(DA) SOBRE A TRANSIÇÃO DE FASE DE FRAGMENTOS DE BICAMADA DE DODAB	80
4.3- EFEITO DA NATUREZA DO ÂNION SOBRE ESTABILIDADE COLOIDAL E COMPORTAMENTO DE FASE DE DODAB BF.....	88
4.4- EFEITO DE FRAGMENTOS DE BICAMADA DE DODAB SOBRE ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE POLI(DA)	99
4.5- ESTABILIDADE COLOIDAL DE DODAB BF/OVA/ CpG.....	103
4.6- ESTABILIDADE COLOIDAL DE DODAB BF/BSA/ CpG.....	112
4.7- ESTABILIDADE COLOIDAL DE $\text{Al}(\text{OH})_3$ /OVA/ CpG.....	118
4.8- ATIVIDADE IMUNOADJUVANTE DE DODAB BF/OVA/ CpG E $\text{Al}(\text{OH})_3$ /OVA/ CpG	122

5- CONCLUSÕES	135
6- PERSPECTIVAS	137
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
8- ANEXOS	159

1- Introdução

1.1- Oligodeoxinucleotídeos e suas aplicações

Oligodeoxinucleotídeos (ODNs) são seqüências curtas de DNA simples fita que apresentam uma série de aplicações, desde o uso em ferramentas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), até a preparação de hidrogéis (Murakami e Maeda, 2005; Campolongo *et al.*, 2010). Oligodeoxinucleotídeos podem formar aptâmeros, i.e., estruturas tridimensionais complexas capazes de se ligar com grande afinidade a alvos moleculares definidos, podendo ser utilizados na entrega de cargas para o interior de células específicas (Orava *et al.*, 2010) e também na inibição de enzimas responsáveis pela replicação de vírus como o HIV (Phan *et al.*, 2005).

ODNs podem atuar também como catalisadores de reações químicas, sendo chamados de deoxirribozimas (Breaker, 2004; Silverman, 2009). Tanto aptâmeros quanto deoxirribozimas são utilizados na fabricação de biosensores (Navani e Li, 2006) capazes de detectar, por exemplo, contaminantes metálicos em amostras de água com sensibilidade da ordem de nanomolares (Li e Lu, 2000; Liu e Lu, 2005; Merino e Weeks, 2005).

Os ODNs também podem ter aplicações terapêuticas, promovendo o reparo de mutações pontuais de DNA (Gamper *et al.*, 2000) ou o silenciamento de genes específicos (Fichou e Férec, 2006). ODNs antisense são desenhados para hibridizar especificamente com um RNA mensageiro (mRNA) dentro de uma célula, inibindo a produção da proteína correspondente a essa seqüência “sense” (Shi e Hoekstra, 2004; Juliano *et al.*, 2008). Desde que, em 1978, foi demonstrado que ODNs sintéticos complementares ao mRNA do vírus de sarcoma de Rous são capazes de inibir a replicação viral (Zamecnik e Stephenson, 1978), os ODNs antisense são considerados uma grande promessa como agentes terapêuticos. De fato, 20 anos depois desse trabalho pioneiro, o primeiro ODN antisense foi licenciado como

medicamento para tratar a retinite causada por citomegalovírus (Marwick, 1998). Além disso, a tecnologia antisense tem sido muito utilizada em pesquisa básica de expressão e função de novos genes (De-Backer *et al.*, 2001; Dean, 2001; Juliano *et al.*, 2008).

Acredita-se que os oligodeoxinucleotídeos antisense inibem a expressão gênica bloqueando estericamente a função do mRNA ou promovendo a degradação do mRNA mediada por enzimas (Shi e Hoekstra, 2004). Assim, ODNs antisense podem paralisar a etapa de tradução do mRNA em proteína, alterar seu “splicing” ou ativar enzimas capazes de degradá-lo como a RNase H. Um dos maiores desafios para o uso da tecnologia antisense é entregar os ODNs até os seus alvos. Existem vários obstáculos a serem vencidos: degradação dos ODNs por nucleases, aumento da eficiência de captação pelas células e degradação pelo endossomo são alguns exemplos (Shi e Hoekstra, 2004; Juliano *et al.*, 2008).

Para evitar a degradação de ODNs por nucleases, são feitas modificações em sua estrutura química (Wilson e Keefe, 2006). Átomos de oxigênio do esqueleto nativo de fosfodiéster podem ser substituídos por enxofre (fosforotioato), boranas (boranofosfato) ou grupos metil (metilfosfonato), como mostrado na Figura 1.

O peso molecular (5- 10kDa) e as cargas negativas dos ODNs impedem sua difusão passiva através da membrana para o interior das células (Mönkkönen e Urtti, 1998). Apesar de ODNs poderem ser capturados por endocitose mediada por receptor (Yakubov *et al.*, 1989), a eficiência desse processo é pequena e faz com que a entrega de ODNs para células dependa de carreadores, como lipídios e polímeros catiônicos (Shi e Hoekstra, 2004; Yang e Mahato, 2010).

Figura 1- Esquema de oligodeoxinucleotídeos com a estrutura nativa de ligações fosfodiéster e com estruturas modificadas.

1.2- Bicamadas catiônicas: características e aplicações

A auto-associação de lipídios e outros anfifílicos em dispersão aquosa é determinada por forças de interação de Van der Waals, efeito hidrofóbico, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (Israelachvili, 1992). O tipo de estrutura formada por lipídios que se auto-associam depende da geometria de suas moléculas. Assim, lipídios com grande cabeça polar e pequena secção transversal das cadeias de alquil têm uma geometria semelhante a um

cone, se auto-associam em micelas e exibem a chamada curvatura de membrana positiva. Lipídios que apresentam áreas ocupadas pela cabeça e pela secção transversal semelhantes têm forma cilíndrica e se auto-associam em bicamadas. Já os lipídios que apresentam cabeças pequenas exibem curvatura de membrana negativa e adotam fases invertidas, como a hexagonal H_{II} (Israelachvili, 1992; Ilarduya *et al.*, 2010). A Figura 2 esquematiza essas geometrias.

Figura 2- Representação esquemática das estruturas de fase de lipídios em função de sua geometria (adaptado de Wasungu e Hoekstra, 2006).

A demonstração de que fosfolipídios são capazes de se auto-associar em dispersão aquosa formando vesículas capazes de aprisionar solutos de forma seletiva (Bangham *et al.*, 1965) iniciou uma nova área de pesquisa para a entrega de drogas, enzimas e vacinas (Gregoriadis, 1995).

Desde o primeiro uso de lípide catiônico para a entrega de plasmídeos (Felgner *et al.*, 1987) e oligodeoxinucleotídeos (Bennett *et al.*, 1992), mais de vinte lipídios catiônicos diferentes foram desenvolvidos com a finalidade de entregar DNA (Hart, 2005). Além de possuírem uma porção hidrofóbica correspondente às cadeias de alquil de tamanho variável,

suas cabeças catiônicas podem pertencer a diferentes grupos como aminas, amônio quaternário, guanidínio, amidina e piridínio, entre outros (Hart, 2005; Ilarduya *et al.*, 2010). Assim, os lipídios catiônicos são facilmente produzidos em escala industrial e permitem modificações químicas para propósitos específicos (Wasungu e Hoekstra, 2006). De fato, além de carreadores, os lipídios catiônicos podem servir como catalisadores de reações químicas (Cuccovia *et al.*, 1989), microbicidas (Campanhã *et al.*, 1999; Campanhã *et al.*, 2001) e moldes para a polimerização e deposição de materiais (Hubert *et al.*, 2000).

1.3- Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e bicamadas catiônicas

Arranjos supramoleculares de oligodeoxinucleotídeos e bicamadas catiônicas na forma de vesículas, conhecidos como lipoplexes, foram extensivamente investigados quanto a suas características morfológicas (Jääskeläinen *et al.*, 1998; Weisman *et al.*, 2004) e físico-químicas (Meidan *et al.*, 2000). Até mesmo o efeito da sequência de bases de ODN na formação de arranjos com bicamadas catiônicas foi investigado (Meidan *et al.*, 2001).

A formação espontânea de arranjos supramoleculares de bicamadas catiônicas e ODNs deve-se às interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos lipídios e as cargas negativas dos grupos fosfato dos ODNs (Meidan *et al.*, 2000; Barteau *et al.*, 2008). De fato, o aumento da força iônica do meio blinda a atração eletrostática entre ODNs e lipídios catiônicos e resulta na dessorção de ODNs. Entretanto, essa dessorção ocorre apenas em forças iônicas que excedem em muito os níveis fisiológicos (Mitrakos e Macdonald, 2000).

O efeito hidrofóbico também parece ter um papel muito importante na formação dos arranjos e no transporte do DNA para as células. Esse é o caso não só para lipídios (Wang *et al.*, 2006), mas também para polímeros catiônicos (Lee *et al.*, 1998; Masotti *et al.*, 2007). Estudos de nosso grupo foram pioneiros na sugestão da importância do efeito hidrofóbico na interação entre DNA dupla fita e bicamadas catiônicas; isso porque as bases nitrogenadas de

DNA podem interagir com cadeias hidrocarbônicas das bicamadas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), levando à perda da integridade de vesículas catiônicas e à separação da dupla fita de DNA (Kikuchi *et al.*, 1999; Kikuchi e Carmona-Ribeiro, 2000).

Através de espectroscopia de dicroísmo circular e modelagem molecular, mostrou-se que bicamadas catiônicas induzem alteração conformacional de um nucleotídeo simples como a deoxiadenosina monofosfato (dAMP), sendo que o anfifílico análogo de cadeia única, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), não teve esse efeito (Nantes *et al.*, 2003). Esse fenômeno simples de mudança conformacional de um único nucleotídeo ocasionado pela interação hidrofóbica com a bicamada pode estar diretamente implicado na desnaturação descrita anteriormente (Kikuchi e Carmona-Ribeiro, 2000).

Para aplicações em transfecção, os lipídios catiônicos são freqüentemente misturados com lipídios neutros como dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), originando bicamadas catiônicas mistas. DOPE é capaz de promover a conversão de uma fase lamelar em uma fase invertida que facilitaria a fusão com membranas biológicas, o que lhe confere uma característica fusogênica (Wasungu e Hoekstra, 2006). De fato, foi demonstrado que a ligação de ODNs a bicamadas catiônicas mistas diminui a repulsão eletrostática entre os lipídios catiônicos e permite que todo o complexo passe de fase lamelar para invertida (Mitrakos e McDonald, 2000). Essa conversão também é observada com o aumento da força iônica, por exemplo, em meio de cultura, o que provoca grande variabilidade no tamanho e morfologia dos arranjos e pode comprometer seu uso como sistema de entrega de DNA (Jääskeläinen *et al.*, 1998).

A ligação inicial de lipoplexes a células de mamíferos parece ser mediada pela interação eletrostática entre os arranjos com carga positiva e os proteoglicanos negativamente carregados da superfície célula (Mislick e Baldeschwieler, 1996; Ruponen *et al.*, 2001; Wiethoff *et al.*, 2001). O escape do endossomo, após internalização dos arranjos

supramoleculares, também parece depender de efeitos eletrostáticos: fosfolipídios negativamente carregados da membrana do endossomo seriam capazes de formar pares iônicos neutros com os lipídios catiônicos, liberando assim os ODNs para o citoplasma (Zelphati e Szoka, 1996; Ilarduya *et al.*, 2010).

1.4- Brometo de dioctadecildimetilamônio e suas aplicações.

Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) é um lipídio catiônico formado por um grupo amônio quaternário ao qual estão ligadas duas cadeias com 18 carbonos cada. Devido à geometria molecular aproximadamente cilíndrica, DODAB é capaz de se autoassociar em dispersão aquosa em bicamadas abertas ou fechadas dependendo do método de preparação (Carmona-Ribeiro, 1992): o método de vaporização clorofórmica (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983) e o de aquecimento acima da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina (Katz *et al.*, 1995) geram vesículas grandes (DODAB LV); o método de sonicação com sonda (tip) gera fragmentos de bicamada (DODAB BF) abertos e pequenos (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991; Carmona-Ribeiro, 2003). A Figura 3 mostra a estrutura de DODAB e de suas bicamadas em dispersão aquosa.

DODAB LV possuem diâmetro hidrodinâmico médio (Dz) de cerca de 400nm (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro e Midmore, 1992) e são unilamelares, conforme sugerido pela ausência de picos de difração em ensaios de espalhamento de raios X em baixo ângulo (Saveyn *et al.*, 2009).

DODAB BF possuem Dz de aproximadamente 90nm (Vieira *et al.*, 2006). As principais evidências em favor da existência de fragmentos em dispersões sonicadas de DODAB são: 1- ausência de resposta osmótica, indicando ausência de compartimento aquoso interno (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro, 1992); 2- visualização

direta por microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM) (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991) ou crio-TEM (Andersson *et al.*, 1995; Hammarström *et al.*, 1995); 3- dados de espalhamento de luz quase-elástico e de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (Pansu *et al.*, 1990; Feitosa *et al.*, 1997) e 4- coexistência de fases fluida e gel na bicamada (Benatti *et al.*, 2001).

Figura 3- Estrutura química da molécula de DODAB (A); bicamada fechada (DODAB LV) formada por vortexação acima da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina – T_m (B); e fragmentos de bicamada obtidos por sonicação com tip também acima da T_m (C).

As características de tamanho, carga e hidrofobicidade de DODAB BF levaram a novas aplicações na solubilização de drogas hidrofóbicas como anfotericina B e miconazol (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001; Pacheco e Carmona-Ribeiro, 2003; Vieira *et al.*, 2006) e na funcionalização de partículas de sílica (Moura e Carmona-Ribeiro, 2003) e de poliestireno sulfato (Rosa *et al.*, 2008).

A estabilidade coloidal (ocorrência de agregação ou fusão de bicamadas) e a estrutura de bicamadas (arranjo das moléculas de surfactante) foram extensamente caracterizadas para vesículas grandes e fragmentos de bicamada de DODAB e de haletos homólogos em várias condições experimentais, como na presença de diferentes forças iônicas e contra-íons (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1984; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1985; Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1986; Carmona-Ribeiro, 1993; Blandamer *et al.*, 1995; Nascimento *et al.*, 1998). Da mesma forma, as interações entre nucleotídeo e DODAB LV (Kikuchi *et al.*, 1999) ou entre filamentos longos de DNA dupla-fita e DODAB LV ou DODAB BF (Kikuchi e Carmona-Ribeiro, 2000) foram caracterizadas. As interações entre DNA dupla-fita e nanopartículas de poliestireno sulfato recobertas por DODAB mostram que é possível preparar um arranjo mimético de nucleossomo (Rosa *et al.*, 2008). Recentemente, novos usos vêm sendo descritos para fragmentos de bicamada, como imobilização de proteínas e preparação de partículas biomiméticas (Carmona-Ribeiro, 2006; Carmona-Ribeiro, 2010). Entretanto, não há registro na literatura dos efeitos de nucleotídeo ou oligodeoxinucleotídeo sobre a estabilidade coloidal e a estrutura de bicamada de DODAB BF.

Outra aplicação importante do DODAB que seria seu uso como imunoadjuvante vem sendo descrita há mais de 40 anos (Gall, 1966; Snippe *et al.*, 1997), i.e., muito antes da descrição de que DODAB se autoassocia em bicamadas (Kunitake *et al.*, 1977). Apesar disso, os mecanismos de ação adjuvante de DODAB ainda não são bem conhecidos. Korsholm e colaboradores mostraram que a adsorção de antígeno sobre a superfície de DODAB LV promove a captura e a apresentação do antígeno por células dendríticas - DCs (Korsholm *et al.*, 2007). Também mostraram que a captura das vesículas transportando o antígeno por DCs é um processo ativo e dependente da actina, já que é inibido em baixa temperatura (4°C) e em presença de citocalasina-D, que é um inibidor da polimerização da actina e, portanto, da endocitose e do tráfego celular dependentes de actina (Korsholm *et al.*, 2007). Recentemente

foi demonstrado que a administração de antígenos adsorvidos sobre DODAB LV resulta na formação de um depósito de antígenos no sítio de injeção (Henriksen-Lacey *et al.*, 2010). Esse depósito é detectável por até duas semanas após a injeção, e contrasta com a rápida disseminação do antígeno sem carreador (Henriksen-Lacey *et al.*, 2010). Assim, é possível que DODAB induza a liberação prolongada de antígenos para células imunes (efeito *depot*).

Em geral, DODAB é muito eficiente para induzir respostas imunes celular e humoral (Katz *et al.*, 1995). DODAB LV foram utilizadas com sucesso para induzir resposta imune contra haptenos (Dailey e Hunter, 1974; Snippe *et al.*, 1978; Snippe *et al.*, 1980) e antígenos tumorais (Prager *et al.*, 1985), virais (Kraaijeveld *et al.*, 1980; Kraaijeveld *et al.*, 1983; Molitor *et al.*, 1984; Smith e Ziola, 1986; Ziola e Smith, 1987; Katz *et al.*, 1991; Katz *et al.*, 1993) e bacterianos (Tsuruta *et al.*, 1997; Davidsen *et al.*, 2005). DODAB já foi testado em humanos em combinação com o toxóide tetânico (Veronesi *et al.*, 1970; Stanfield *et al.*, 1973). Recentemente, complexos entre DODAB BF e antígenos proteicos como albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA), antígenos purificados de *Taenia crassiceps* ou uma proteína recombinante de *Mycobacterium leprae* foram testados *in vivo*, resultando em potencialização da resposta celular contra o antígeno testado (Lincopan *et al.*, 2009). Um sistema que utilizasse bicamadas de DODAB para carregar conjuntamente CpG e antígeno permitiria, em princípio, reduzir a dose aplicada de antígeno e direcionar a resposta imune para um padrão de resposta imunológica mediada por células.

1.5-Respostas imunes inata e adaptativa

Os vertebrados desenvolveram sistemas de defesa para lidar com a constante ameaça colocada por patógenos do ambiente. No caso do sistema imune de mamíferos, existem três mecanismos principais de defesa: 1- barreiras físicas (como a pele, o epitélio ciliado e as

membranas mucosas) e químicas (como enzimas destrutivas presentes em secreções); 2- resposta imune inata e 3- resposta imune adaptativa (Storni *et al.*, 2005; Moser e Leo, 2010).

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra patógenos que penetraram o corpo. É caracterizada por uma resposta rápida contra o invasor e pela falta de um processo de aprendizagem. As células do sistema imune inato podem residir nos tecidos (como macrófagos e células dendríticas) ou patrulhar o organismo através da circulação sanguínea e linfática (como neutrófilos, eosinófilos e monócitos). Já a imunidade adaptativa representa uma segunda linha de defesa, normalmente ativada quando a imunidade inata não elimina a ameaça de forma eficiente. É caracterizada por uma resposta relativamente lenta, dependente do encontro com o patógeno, e pela formação de uma memória imunológica que permite uma proteção eficiente do organismo contra uma reinfecção com o mesmo patógeno. As células do sistema imune adaptativo são os linfócitos B e T, que podem ser encontrados na circulação sanguínea e linfática e em órgãos linfóides como os linfonodos e o baço. As células dos sistemas inato e adaptativo interagem para produzir resposta articulada e eficiente contra o patógeno invasor (Abbas *et al.*, 2000; Moser e Leo, 2010).

Os patógenos invasores apresentam estruturas moleculares características que são altamente conservadas e que são ausentes ou restritas nos vertebrados, como, por exemplo, componentes da parede celular bacteriana. Essas estruturas são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs).

Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (*pattern-recognition receptors*, PRRs), que são expressos não apenas em células do sistema imune mas também em células do estroma, como fibroblastos e células endoteliais (Storni *et al.*, 2005; Moser e Leo, 2010).

Entre os PRRs, destacam-se os da família TLR (*Toll-like receptors*). As moléculas de TLR são proteínas transmembrana do tipo I que apresentam um motivo intracelular

conservado (*Toll interleukin-1 receptor*, TIR), responsável pelo início da transdução de sinal, e um domínio extracelular ou intravesical contendo repetição rica em leucina (*leucin-rich repeat*, LRR), responsável pela interação com o ligante (Romagne, 2007). O membro fundador dessa família, *Toll*, é responsável por respostas contra fungos em moscas *Drosophila* (Lemaitre *et al.*, 1996). Em humanos foram identificados 10 TLRs, cujos ligantes e localizações nas células são descritos na Tabela 1 (Romagne, 2007; Moser e Leo, 2010).

O reconhecimento de PAMPs por PRRs ativa a secreção celular de mediadores químicos como citocinas e quimiocinas, que recrutam células do sistema imune inato para o sítio de infecção. Nesse sítio, as células imunes engolfam os patógenos e os digerem em vesículas intracelulares, num processo conhecido como fagocitose. Patógenos que escapam do reconhecimento e/ou degradação pelo sistema imune inato enfrentam uma resposta mais específica do sistema imune adaptativo. Esse sistema reconhece antígenos específicos através de anticorpos e de receptores presentes na superfície de células T (*T cell receptors*, TCRs).

Tabela 1 – Receptores *Toll-like* (TLRs), sua localização e seus ligantes (adaptado de Moser e Leo, 2010; Romagne, 2009).

TLR	Localização	Ligantes (PAMPs)
1	Membrana plasmática	Peptideoglicanos, lipopetídeos
2	Membrana plasmática	Lipopeptídeos, ácido lipoteicóico, glicolipídeos, zimosan
3	Endossomo	dsRNA, siRNA, mRNA
4	Membrana plasmática	Lipopolissacarídeo, proteína de fusão do vírus do sarcoma de Rous (RSV), tumor mamário, proteína de envelope de vírus, fosforilcolina, proteína de choque térmico (HSP), defensina 2, fibrinogênio, ácido hialurônico, citocina HMGB 1
5	Membrana plasmática	Flagelina
6	Membrana plasmática	Lipopetídeos
7	Endossomo	ssRNA, imidazoquinolina, resiquimod
8	Endossomo	ssRNA, resiquimod
9	Endossomo	DNA CpG
10	Membrana plasmática	Desconhecido

Anticorpos, também chamados de imunoglobulinas, são glicoproteínas produzidas por linfócitos B que se ligam a antígenos com alta especificidade e afinidade, neutralizando-os. Pelo fato de poderem ser secretados no sangue e em outros fluidos corporais, eles permitem que os linfócitos B combatam infecções à distância, através do reconhecimento de antígenos solúveis, numa resposta imune conhecida como humoral (Moser e Leo, 2010).

Diferentemente dos anticorpos, os receptores de antígeno das células T não são capazes de reconhecer antígenos solúveis e dependem da apresentação de antígenos por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC) na superfície de outras células, delineando portanto uma resposta celular. Dependendo da classe de moléculas de MHC envolvida na apresentação, os antígenos podem ser reconhecidos por células T citotóxicas (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs), que conseguem induzir a morte de células infectadas, danificadas ou disfuncionais, ou por células T auxiliaadoras (*T helper lymphocytes*, Th), que são capazes de regular a ação de células do sistema imune inato, de linfócitos B e de CTLs (Moser e Leo, 2010). A apresentação de antígenos é acompanhada por outros estímulos como a secreção de citocinas e a exposição de moléculas superficiais co-estimuladoras, sendo uma etapa crucial da resposta imune adaptativa porque permite aos linfócitos distinguir antígenos próprios daqueles que são oriundos de patógenos. Assim, o papel das células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells*, APCs), como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, é crítico na elaboração de uma resposta imune satisfatória.

Dentre as APCs, as células dendríticas (*dendritic cells*, DCs) destacam-se pela capacidade de conectar os sistemas imunes inato e adaptativo. Nos tecidos periféricos as DCs capturam micróbios e partículas por fagocitose ou endocitose mediada por receptor e recolhem amostras do fluido extracelular por macropinocitose (Inaba *et al.*, 1993; Reis e Sousa *et al.*, 1993; Sallusto e Lanzavecchia, 1995; Banchereau e Steinman, 1998). Esses

mecanismos garantem que as DCs capturem antígenos de vários tamanhos (Hillaireau e Couvreur, 2009). DCs são tão eficientes que conseguem capturar concentrações de antígeno da ordem de pico e nanomolar (Sallusto e Lanzavecchia, 1995; Banchereau e Steinman, 1998).

Quando os antígenos capturados são considerados perigosos, e.g. através do reconhecimento por PRRs, as DCs sofrem um processo de maturação e migram para órgãos linfóides onde residem linfócitos imaturos (Moser e Leo, 2010). Lá, a apresentação de antígenos por DCs é acompanhada por estímulos que promovem a amplificação, sobrevivência e diferenciação dessas células T. As células dendríticas também possuem a propriedade de apresentar antígenos capturados através de diferentes classes de moléculas de MHC, i.e., de ativar tanto células T auxiliaadoras (Th) quanto citotóxicas (CTLs), num processo conhecido como apresentação cruzada (Svensson *et al.*, 1997; Storni *et al.*, 2005; Moser e Leo, 2010). Além disso, DCs induzem a formação de células T de memória (Steinman e Banchereau, 2007). A Figura 4 resume o processo de apresentação de antígenos por DCs.

Dependendo do estímulo durante o processo de apresentação de antígenos, Th se diferenciam em células maduras que secretam determinado padrão de citocinas. Baseado nesse padrão, as Th antígeno-específicas podem ser classificadas em diferentes grupos (Mosmann *et al.*, 1986). Assim, células Th que se diferenciaram na presença de interleucina (IL)-12 secretada por DCs ou por macrófagos passam a secretar interferon- γ (IFN- γ) e IL-2 e são classificadas como células Th1. Já as células Th que se diferenciaram em presença de IL-4 passam a secretar IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e são classificadas como células Th2. As fontes celulares de IL-4 que estimulam Th2 não são claramente conhecidas e podem incluir mastócitos, basófilos, células “natural killer” (NK) e outras células T (Liew, 2002). Entretanto, sabe-se que DCs induzem a ativação de células Th2 (Maldonado-López *et al.*,

1999). Foi demonstrado também que as células Th1 e Th2 são capazes de regular reciprocamente sua atividade através das citocinas que secretam (Gajewski e Fitch, 1988; D'Andrea *et al.*, 1993; Demeure *et al.*, 1994).

Figura 4- Esquema de captura e apresentação de antígenos por células dendríticas (DCs): **A-** Antígenos (Ags) são capturados por DCs nos tecidos periféricos e processados para formar complexos peptídeos-MHC. DCs reconhecem antígenos diretamente através de receptores de reconhecimento de sinais (PRRs) ou indiretamente através de células do estroma. O reconhecimento do antígeno ativa DCs, que migram para órgãos linfóides, onde estimulam linfócitos T auxiliares (Th) e citotóxicos (CTLs) a migrar para o foco de infecção para eliminar os patógenos e/ou células infectadas. Células B ativadas por Th diferenciam-se em células plasmáticas que produzem anticorpos (Igs) contra o patógeno. Citocinas secretadas por DCs também ativam células da imunidade inata. **B-** Nos órgãos linfóides, os antígenos apresentados por MHC em DCs são reconhecidos por receptores de linfócitos T (TCR). DCs secretam citocinas e exibem moléculas co-estimuladoras que ativam os linfócitos T. As moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80/86, por exemplo, são reconhecidas nos linfócitos por CD40L e CD28, respectivamente (adaptado de O'Hagan e Valiante, 2003).

Do ponto de vista prático, as citocinas secretadas pelas Th têm grande efeito sobre a resposta adaptativa. O IFN- γ secretado pelas células Th1 possui efeitos anti-virais (Moser e Leo, 2010), estimula a fagocitose, a apresentação de antígenos para células T com o aumento de expressão de moléculas de MHC-I e de MHC-II e a morte de patógenos intracelulares (Spellberg e Edwards, 2001). Além disso, IFN- γ estimula a produção de anticorpos do isotipo IgG2a e inibe a produção de anticorpos IgG1 em camundongos (Snapper e Paul, 1987; Finkelman *et al.*, 1988).

Assim, as células Th1 estimulam tanto uma resposta imune humoral quanto uma resposta imune celular eficiente contra patógenos intracelulares.

Por outro lado, as células Th2 estimulam a produção de grandes títulos de anticorpos, já que IL-4, IL-10 e IL-13 ativam a proliferação de células B, a produção e a mudança de isotipos de anticorpos com a produção de IgG1 e IgE (Stevens *et al.*, 1988; Lai e Mosmann, 1999; Spellberg e Edwards, 2001). Assim, as células Th2 induzem uma forte resposta humoral que está associada à proteção contra grandes parasitas extracelulares como helmintos (Korenaga *et al.*, 1991; Finkelman *et al.*, 2004). Entretanto, a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 pelas células Th2 tem sido fortemente implicada no desenvolvimento de respostas alérgicas como asma (Lucaks *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

A existência de respostas mediadas por diferentes populações de células T (respostas Th1 e Th2) explica a relação inversa muitas vezes observada entre imunidades celular e humoral, i.e., porque os níveis de anticorpos produzidos em uma resposta imune são inversamente proporcionais aos níveis de imunidade mediada por células em ensaios de hipersensibilidade do tipo tardio (Parish, 1971; Liew, 2002). As características das células Th1 e Th2 estão sumarizadas na Figura 5.

A incorporação de outros critérios, como os fatores de transcrição e as modificações epigenéticas que regulam a expressão de genes de citocinas, e a recente descrição de outros

grupos de células Th, como Th17, Th22, Th9, Th folicular e T regulador, mostram que a classificação baseada no perfil de citocinas secretadas é arbitrária e peca pela rigidez (Bluestone *et al.*, 2009). Entretanto, como os limites da plasticidade dos grupos de células Th ainda não foram definidos, essa classificação ainda não pode ser substituída (Bluestone *et al.*, 2009).

Figura 5- Esquema da indução e regulação de células Th1 e Th2. A célula precursora Th pode se diferenciar em células Th1 ou Th2 dependendo das citocinas presentes no micro-ambiente. IL-12 estimula células Th1, enquanto IL-4 promove células Th2. As citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 podem agir como fatores autócrinos de crescimento e também como fatores inibitórios para o grupo oposto. Th1 intensifica a síntese de IgG2a por células B através de IFN-γ, enquanto Th2 induz a produção de IgE e de IgG1 através de IL-4. A função de Th1 é mediar a destruição de patógenos intracelulares. Th2 combate helmintos e aumenta reações alérgicas. NK é célula “natural killer” (adaptado de Liew, 2002).

1.6- Vacinas e adjuvantes

Os benefícios das vacinas atualmente disponíveis para a saúde pública são ultrapassados apenas pela introdução de suprimentos de água potável (O'Hagan e Valiante, 2003). Entretanto, a existência de doenças para as quais ainda não há vacinas (como AIDS, hepatite C, dengue e malária), a redução da quantidade de antígeno inoculado e a promoção de imunização efetiva com a aplicação de dose única ainda representam grandes desafios na área de desenvolvimento de vacinas (O'Hagan e Valiante, 2003; Wilson-Welder *et al.*, 2009).

O objetivo da vacinação é gerar uma resposta imune forte e duradoura contra infecção (Wilson-Welder *et al.*, 2009). Nos trabalhos pioneiros de Jenner (varíola) e Pasteur (cólera), formas menos virulentas do patógeno inteiro foram usados como vacina. Entretanto, o uso de patógenos vivos pode resultar em efeitos adversos, como reportado para as vacinas contra coqueluche (Donnelly *et al.*, 2001) e Sabin contra poliomielite (Cherkasova *et al.*, 2002).

Para diminuir os riscos de efeitos colaterais, foram desenvolvidas vacinas inativadas, que não são capazes de se replicar nos hospedeiros, e vacinas de subunidades, que contêm apenas pedaços dos patógenos (Storni *et al.*, 2005). Diferentemente das vacinas vivas atenuadas, essas vacinas são pouco imunogênicas, sendo incapazes de produzir respostas fortes mediadas por células T e requerendo a adição de adjuvantes (Storni *et al.*, 2005; O'Hagan e De Gregorio, 2009).

Adjuvantes (do Latim *adjuvare*, “que ajuda”) são compostos que intensificam a resposta imune contra antígenos co-inoculados (Aguilar e Rodríguez, 2007). Um bom adjuvante deve ser estável (resistente à degradação), barato de produzir, imunologicamente inerte, compatível com diferentes tipos de antígeno e capaz de promover uma resposta imune apropriada (humoral ou celular) dependendo da necessidade para a proteção do organismo (Aguilar e Rodríguez, 2007).

A eficiência de um adjuvante depende de sua capacidade de entregar os antígenos para APCs e de ativá-las (O'Hagan e De Gregorio, 2009), e nesse contexto é muito importante

direcionar os antígenos especificamente para as células dendríticas, que são as ativadoras mais eficientes de células T (Storni *et al.*, 2005; Moser e Leo, 2010). Assim, a eficiência de apresentação de um antígeno por um sistema particulado depende de características físico-químicas como tamanho, carga e hidrofobicidade (Peek *et al.*, 2008; Rice-Ficht *et al.*, 2010). Foi demonstrado, por exemplo, que partículas de diferentes tamanhos são direcionadas para populações de DCs distintas (Manolova *et al.*, 2008), o que pode resultar em diferentes formas de reconhecimento pelo sistema imune inato. De fato, partículas de tamanhos diferentes induzem respostas imunes inatas qualitativamente diferentes: partículas nanométricas disparam respostas contra vírus e partículas micrométricas disparam respostas contra bactérias e fungos (Rettig *et al.*, 2010). Além das características físico-químicas, a qualidade da resposta imune também depende da dose de antígeno e da via de imunização (Spellberg e Edwards, 2001; Aguilar e Rodríguez, 2007).

A resposta resultante da ativação das células imunes por diferentes PRRs pode ser caracterizada determinando-se quais citocinas e isotipos de anticorpo são secretados (O'Hagan e Valiante, 2003; Storni *et al.*, 2005; Steinman e Banchereau, 2007). Em muitos casos, como o de patógenos intracelulares, uma resposta Th1 (que possui componentes celular e humoral) é preferível em relação a uma resposta Th2 (que possui apenas o componente humoral). Esse é o caso do modelo de leishmaniose em camundongos: enquanto em uma resposta dominada por IL-4 e IgG1 (resposta Th2) os camundongos não são protegidos contra a infecção, em uma resposta dominada por IFN- γ e IgG2a (resposta Th1) eles são capazes de eliminá-la (Heinzel *et al.*, 1991; Kopf *et al.*, 1996; Stamm *et al.*, 1998; Wilson-Welder *et al.*, 2009).

Os adjuvantes devem apresentar um risco mínimo aos indivíduos que serão vacinados, mas os testes toxicológicos pré-clínicos podem não ser suficientes para prever efeitos adversos em humanos (O'Hagan e De Gregorio, 2009). O adjuvante incompleto de Freund,

por exemplo, foi utilizado em vacinas humanas contra vírus, mas retirado do mercado devido à incidência ocasional de reações locais severas (O'Hagan e De Gregorio, 2009). Isso faz o desenvolvimento de adjuvantes ser um processo demorado e difícil, o que é ilustrado pelo monopólio dos sais de alumínio, conhecidos genericamente como alum, na preparação de vacinas humanas (Aguilar e Rodríguez, 2007). A atividade adjuvante de alum foi descrita pela primeira vez em 1926 (Glenny *et al.*, 1926) e desde então compostos como hidróxido e fosfato de alumínio têm sido empregados mundialmente na preparação de uma série de vacinas (Aguilar e Rodríguez, 2007; Mbow *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação adjuvante de alum não é inteiramente conhecido. Uma idéia é que alum forma um depósito de antígeno no sítio de injeção, e que a liberação gradual de antígeno aumenta o tempo de interação com APCs (efeito *depot*). Outra possibilidade é que alum aumente a captura de antígenos adsorvidos sobre sua superfície particulada. O último mecanismo proposto é que alum é capaz de estimular diretamente a secreção de citocinas de resposta Th2 (Lindblad, 2004; Peek *et al.*, 2008). A tendência de sais de alumínio de estimular resposta Th2, que fica clara na sua ineficiência em induzir hipersensibilidade tardia em roedores (Lindblad, 2004), é uma desvantagem desse adjuvante. Outras desvantagens são respostas alérgicas e formação de granulomas (Lindblad, 2004; Aguilar e Rodríguez, 2007; Peek *et al.*, 2008).

A Tabela 2 mostra o estágio de desenvolvimento de adjuvantes testados em humanos. Essa tabela mostra que estão sendo testadas combinações de adjuvantes (Mbow *et al.*, 2010). Outra tendência é utilizar adjuvantes capazes de estimular receptores do sistema imune inato (Romagne, 2007).

Tabela 2 – Adjuvantes testados em humanos (adaptado de O’Hagan e DeGregorio, 2009; Mbow *et al.*, 2010).

Nome	Fabricante	Classe	Indicação	Estágio de desenvolvimento
Alum	Vários	Sal mineral	Vários	Licenciado
MF59	Novartis	Emulsão O/W	Influenza	Licenciado (UE)
Lipossomos	Crucell	Vesículas de lipídio	HAV	Licenciado (UE)
AS03	GSK	Emulsão O/W + α -tocoferol	Gripe pandêmica	Licenciado (UE)
AS04	GSK	MPL + Alum	HBV, HPV	Licenciado (UE)
Montanide	Vários	Emulsão W/O	Malária, câncer	Fase III
ISS	Dynavax	ODN + Alum	HBV	Fase III
AS01	GSK	MPL + lipossomos + QS21	Malária, TB	Fase II
AS02	GSK	MPL + Emulsão O/W + QS21	Malária	Fase II
RC-529	Dynavax	MPL sintético + Alum	HBV	Fase II
CpG 7909	Coley/Pfizer, Novartis	ODN + Alum ou + MF59	HBV, malária, HCV	Fase II
PLG	Novartis	Micropartícula de poli(lactídeo)-co-glicolídeo	Vacina de DNA contra HIV	Fase I
Flagelina	Vaxinnate	Flagelina ligada a antígeno	Gripe	Fase I
QS21	Antigenics	Saponina	Vários	Fase I
Iscom	CSL, Isconova	Saponinas + colesterol + fosfolipídios	Vários	Fase I
IC31	Intercell	Peptídeo + ODNs	TB	Fase I
MF59 + MTP-PE	Chiron/Novartis	MDP lipidado + Emulsão O/W	HIV, gripe	Fase I

O/W = óleo-em-água; W/O = água-em-óleo; MPL = monofosforil-lipídio-A; MDP = muramil-dipeptídeo; HAV, HBV e HCV = vírus da hepatite A, B e C; HPV = vírus do papiloma humano; TB = tuberculose; HIV = vírus da imunodeficiência humana; UE = União Européia.

1.7- CpG como adjuvante

Sequências de DNA contendo o dinucleotídeo CpG não-metilado são comuns nos genomas de bactérias e vírus, mas são raras e aparecem metiladas (suprimidas) nos genomas de vertebrados (Krieg, 2002; Krieg, 2006; Vollmer e Krieg, 2009). Assim, sequências de DNA contendo CpG não-metilado são PAMPs reconhecidos pelo sistema imune inato como sinal de perigo. Em 1995, foi demonstrada a ação imunoestimuladora de oligodeoxinucleotídeos CpG através da ativação direta de células B (Krieg *et al.*, 1995). Também foi demonstrado que existe uma sequência mínima (sequência-motivo) com atividade imunoestimuladora: é um hexâmero em que o dinucleotídeo é flanqueado por outros dois pares de bases nas posições 5' e 3'. Para humanos, a sequência-motivo ótima é 5'-GTCGTT-3'; para camundongos é 5'-GACGTT-3' (Krieg *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2001). A partir do ano 2000, TLR9 foi identificado como o receptor de CpG (Hemmi *et al.*, 2000; Rutz *et al.*, 2004; Cornélie *et al.*, 2004).

TLR9 é expresso em humanos exclusivamente em linfócitos B e em células dendríticas plasmocitóides, mas em camundongos ele também é expresso em monócitos e em DCs mielóides (Krieg, 2006). TLR9 está localizado no endossomo, o que impede o reconhecimento acidental de DNA próprio mas permite a detecção eficiente de ácidos nucleicos virais (Krieg, 2006).

Oligodeoxinucleotídeos CpG, independentemente de sua sequência, são endocitados espontaneamente em cultura (Krieg, 2006). Uma vez capturados, eles são direcionados ao endossomo e lá se ligam ao TLR9 provocando mudanças conformacionais alostéricas nos domínios citoplasmáticos de sinalização do receptor, resultando no recrutamento da molécula adaptadora de sinalização MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) (Krieg, 2006; Romagne, 2007; Vollmer e Krieg, 2009). A associação de TLR9 com MyD88 inicia vias de transdução de sinal envolvendo proteínas das famílias IRAK (*interleukin-1 receptor associated kinase*),

IRF (*interferon regulatory factor*), TRAF (*tumor necrosis factor- α receptor associated factor*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Romagne, 2007; Vollmer e Krieg, 2009). Essas vias desembocam na ativação de fatores de transcrição NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), na produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6, TNF- α), antivirais (IFN do tipo I) e imunoregulatórias (IL-10) e na expressão de moléculas co-estimuladoras (Romagne, 2007; Vollmer e Krieg, 2009). O mecanismo de ação de CpG está esquematizado na Figura 6.

Figura 6- Mecanismo de ação de DNA CpG em células dendríticas (DCs). Moléculas de DNA contendo seqüências-motivo CpG são capturadas por endocitose e direcionadas ao endossomo, onde ficam expostas ao TLR9. A ativação de TLR9 por CpG desencadeia vias de sinalização que desembocam na ativação do fator de transcrição NF- κ B, resultando na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras. Esses mensageiros químicos ativam células do sistema imune inato (como monócitos, neutrófilos e células “natural killer” - NK) e células T, resultando em resposta adaptativa do tipo Th1.

Os efeitos finais da ativação de TLR9 por CpG são a ativação de células do sistema imune inato (como monócitos, neutrófilos, células “natural killer”, macrófagos e células dendríticas) e a indução de respostas imunes adaptativas humoral e celular que seguem o padrão Th1 (Krieg, 2006). A resposta imune humoral é intensificada pela sinergia entre TLR9 e o receptor de célula B (Krieg *et al.*, 1995), pela inibição da apoptose de células B (Yi *et al.*, 1998) e pelo estímulo à mudança de classe de imunoglobulinas (Krieg, 2006; Vollmer e Krieg, 2009). A resposta celular é resultado da secreção de citocinas e da ativação de DCs, que intensificam o desenvolvimento de respostas antígeno-específicas de células T citotóxicas e de células Th1 (Sparwasser *et al.*, 2000; Lipford *et al.*, 2000).

A resposta Th1 induzida por CpG pode ser utilizada no tratamento de infecções por patógenos intracelulares, como *Leishmania major* e vírus da hepatite B (Zimmermann *et al.*, 1998; Isogawa *et al.*, 2005); de câncer (Kuramoto *et al.*, 2006; Manegold *et al.*, 2008) e de alergias (Kline *et al.*, 2002; Simons *et al.*, 2004). Nesse último caso, CpG parece ser capaz de redirecionar uma resposta alérgica Th2 para uma resposta Th1, com redução dos sintomas (Krieg *et al.*, 2006).

Outra aplicação de CpG é seu uso como adjuvante em vacinas (Tabela 2). De fato, CpG tem sido testado como adjuvante em vacina contra a hepatite B, sozinho e em combinação com alum (Halperin *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2004). Nesses casos, o oligodeoxinucleotídeo CpG apresenta um esqueleto baseado em ligações fosforotioato ao invés de fosfodiéster, a fim de aumentar sua estabilidade evitando a degradação por nucleases.

A associação entre antígeno e CpG é crítica para a atividade imunoadjuvante (Vollmer e Krieg, 2009). A interação entre DNA e carreador tem sido extensamente caracterizada para as terapias gênica e antisense (Meidan *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Thomas e Klivanov, 2003; Pack *et al.*, 2005; Li e Huang, 2006; Juliano *et al.*, 2008). Nesses casos, o objetivo é entregar DNA íntegro no núcleo celular e no citoplasma e, portanto, é necessário escapar da

degradação no endossomo (Wiethoff e Muddaugh, 2003; Shi e Hoekstra, 2004). Para CpG o objetivo é contrário: o DNA deve ser entregue no endossomo para ser reconhecido por TLR9. Aliás, é interessante o fato de que a ação imunoestimuladora de determinados oligodeoxinucleotídeos antisense foi observada antes de se reconhecer que CpG era um PAMP (Krieg, 2002).

2- Objetivos

O sistema em estudo nesta tese consiste em fragmentos de bicamada catiônica de DODAB, um mononucleotídeo (dAMP) e um oligodeoxinucleotídeo (poli(dA)) modelos para caracterização das interações físico-químicas e um oligodeoxinucleotídeo de interesse terapêutico (CpG) para caracterização da atividade imunoadjuvante.

Este trabalho tem como objetivos:

1- Obter arranjos supramoleculares de fragmentos de bicamada catiônica de DODAB com dAMP ou poli(dA) ou CpG;

2- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos arranjos obtidos (tamanho, potencial-zeta, comportamento de fase da bicamada, estabilidade coloidal);

3- Caracterizar a resposta imune induzida por arranjos de fragmentos de bicamada de DODAB com CpG usando um antígeno modelo, a ovalbumina, e comparar essa resposta com a induzida por um adjuvante convencional, o hidróxido de alumínio.

Para isso, foram utilizadas técnicas como turbidimetria, espalhamento de luz dinâmico, espectroscopias de dicroísmo circular e de fluorescência e calorimetria diferencial de varredura. As respostas imunes foram testadas *in vivo*, e caracterizadas através de ensaios de hipersensibilidade tardia e da dosagem de anticorpos específicos presentes no soro e de citocinas secretadas nos linfonodos.

3- Materiais e Métodos

3.1- Materiais e Reagentes

- água Milli-Q ultrapura
- cloreto de sódio (NaCl), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- fosfato dissódico (Na_2HPO_4) p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- 2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato de sódio (dAMP), 99% de pureza, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- oligodeoxinucleotídeos liofilizados, dessalinizados e com pureza atestada por espectrometria de massa, Integrated DNA Technologies, IA, USA
- brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), 99,9% puro, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), Sanofi-Synthelabo LTDA, RJ, Brasil
- albumina de soro bovino (BSA), Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- ovalbumina (OVA) grau V, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- ovalbumina (OVA) grau II, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- ácido perclórico (HClO_4) p.a. , Cromato produtos Químicos Ltda., Brasil
- molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) p.a. , Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- ácido ascórbico, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- nitrato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) monohidratado, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- álcool etílico p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- difenilcarbazona, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- soluções padrão de pH 4,0; 7,0 e 10,0, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- 2-(10-(1-pireno)-decanoil)-fosfatidilcolina (PyPC), Molecular Probes, OR, USA
- clorofórmio p.a., Cinética Química Ltda., Brasil

- coluna de polimixina B – agarose (Detoxi-Gel Endotoxin Removing kit™), Pierce Biotechnology, IL, USA
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Quick Start Bradford Protein Assay kit™), Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
- kit de lisado de amebócito *Limulus polyphemus* para dosagem de endotoxina (E-Toxate kit™), Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (ConA), Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- Tween-20, Riedel-deHaën AG, Germany
- anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2a, Southern Biotechnology Associates Inc., AL, USA
- conjugado estreptoavidina-peroxidase, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- orto-fenilenodiamina (OPD), Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- ácido sulfúrico (H₂SO₄) p.a. , Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- meio RPMI 1640, Invitrogen Life Technologies, CA, USA
- anticorpos monoclonais XMG1.2; AN18; MAB419; BAF419; MAB417; BAF417; MAB413 e BAF413 para dosagem de citocinas, R&D Systems Inc., MN, USA

3.2- Equipamentos

- máquina de água ultrapura MilliQPlus, Millipore Corporation, MA, USA
- autoclave vertical 415, Fanem Ltda., Brasil
- balança analítica GA110 com precisão de $\pm 0,0001\text{g}$, Ohaus Corporation, NJ, USA
- bloco térmico de alumínio Stuart SBH200D, Bibby Scientific Limited, UK
- sonicador Fisher Scientific 500 Sonic Dismembrator (potência máxima de 400W), Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA
- centrífuga Himac SCR20B, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan
- tubos de vidro para centrífuga Corex 8446 (25mL), DuPont Instruments, USA

- centrífuga Eppendorf 5415R, Eppendorf AG, Germany
- microbureta GS1200A (2mL), Gilmont Instruments Co., IL, USA
- agitador magnético 720, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda., Brasil
- barra magnética, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA
- tubos Falcon de polipropileno de 15mL e 50mL, Techno Plastic Products AG, Switzerland
- filtros de 0,22µm, Techno Plastic Products AG, Switzerland
- tubos de polipropileno de 1,5mL e 2,0mL, Eppendorf AG, Germany
- agitador de tubos (vortex) KMC-1300V, Vision Scientific Co. Ltd., Korea
- microcalorímetro VP-DSC, Microcal Inc., NJ, USA
- espectrofotômetro duplo feixe U-2000, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan
- ZetaPlus Zeta Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation, NY, USA
- espectrofluorímetro F-4500, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan
- espectropolarímetro Jasco-720, Jasco Inc., USA
- pHmetro Digimed DM 22, Digicrom Analítica Ltda., SP, Brasil
- banho com controle de temperatura RM 6, LAUDA GmbH & CO. KG, Germany
- paquímetro eletrônico, L.S. Starrett Co., MA, USA
- estufa de estabilização universal 219, FabbePrimar, Brasil
- micropipetas P10, P200 e P1000, Gilson Inc., WI, USA
- fluxo laminar Trox FLV, Trox do Brasil Ltda., Brasil
- incubadora de células HeraCell, W.C. Heraeus GmbH, Hanau, Germany
- leitor automático de placas de ELISA, Electron Corporation, Shanghai, PRC
- microseringas de vidro (10 e 100µL), Hamilton Co., NV, USA
- seringas de plástico de 1mL, 5mL e 10mL, Saldanha Rodrigues Ltda., Brasil

- cubetas de quartzo com caminho óptico de 10mm e capacidade mínima de 05mL, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- cubetas de fluorímetro de poliestireno, Sigma-Aldrich Co., MO, USA
- cubetas de fluorímetro de quartzo com capacidade de 0,5mL, Hellma GmbH & Co. KG.

3.3- Métodos

3.3.1- Preparo de soluções estoque de nucleotídeo e oligodeoxinucleotídeo

Soluções estoque do nucleotídeo 2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato de sódio (dAMP) foram preparadas através da solubilização em água Milli-Q de dAMP pesado analiticamente. As concentrações das soluções estoque foram confirmadas através da determinação de fosfato (Rouser *et al.*, 1970). Esse método consiste na digestão de dAMP com ácido perclórico a 180°C e subsequente reação do fosfato com molibdato de amônio em presença de ácido ascórbico, formando um complexo azulado que, através de medidas de absorbância na região do visível, permite a comparação com uma curva padrão de fosfato de sódio. Os detalhes experimentais são descritos a seguir:

Três alíquotas de 100 µL da solução problema e alíquotas de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 µL da solução padrão de fosfato de sódio 1mM foram colocadas em tubos de ensaio reservados para dosagem de fosfato, visando obter uma média de absorbância utilizada para calcular a concentração real de fosfato na solução. As amostras foram secas na estufa a 100°C e em seguida, foram adicionados 0,3 mL de ácido perclórico concentrado. Os tubos de ensaio foram fechados com bolas de vidro e aquecidos em bloco térmico na capela a 180°C por 1 hora. Depois de resfriados os tubos, foram adicionados 1 mL de água Milli-Q, 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25% e 0,4 mL de ácido ascórbico 5%. Após adição de cada reagente, as amostras foram agitadas para homogeneização e colocadas em banho de água fervente por

5 minutos, com os tubos fechados com bolas de vidro. A absorbância a 796 nm foi determinada contra o ponto zero da curva padrão.

As soluções estoque de oligonucleotídeos com 10 bases foram preparadas através da solubilização de oligodeoxinucleotídeos liofilizados da marca IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) em água Milli- Q autoclavada para evitar a contaminação com DNases. A sequência de bases do oligodeoxinucleotídeo poli(dA) é 5'- AAA AAA AAA A-3' e a do oligodeoxinucleotídeo CpG é 5'- TTG **ACG** TTC **G** -3', cujas repetições CpG aparecem em negrito. As soluções estoque de oligodeoxinucleotídeos possuíam tipicamente volume de cerca de 100µL e concentração de 10mM.

3.3.2- Preparo de dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)

Fragmentos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB BF) foram produzidos através da dispersão do pó de DODAB em solução aquosa por sonicação. DODAB foi analiticamente pesado e transferido para um erlenmeyer ao qual foram adicionados 25mL de água Milli-Q. O tipo de um sonicador Fisher Scientific 500 Sonic Dismembrator foi então inserido no erlenmeyer até aproximadamente metade da altura de líquido. O processo de sonicação foi realizado em temperaturas entre 50 e 70°C (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983) durante 20 minutos, com o sonicador ajustado para 25% de potência. Após esfriarem até temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (1h / 14000 rpm / 4°C) para remoção de partículas de titânio provenientes do sonicador (Fendler, 1980).

Vesículas unilamelares grandes (DODAB LV) foram preparadas por aquecimento de dispersões aquosas de DODAB (Katz *et al.*, 1995). DODAB foi analiticamente pesado e transferido para um tubo Falcon de 50mL, adicionando-se quantidade suficiente de água

Milli-Q para obter a concentração desejada. A dispersão foi deixada em banho-maria a 60°C por 30 minutos e homogeneizada por agitação do tubo utilizando um “vortex”.

A concentração analítica de cada dispersão foi confirmada através de microtitulação com nitrato de mercúrio II (Schales e Schales, 1941). Esse método consiste em dosar o contra-íon brometo presente no DODAB utilizando difenilcarbazona como solução indicadora. Além de brometo, esse método permite dosar outros haletos. Tipicamente, foram preparadas soluções estoque de 2mM DODAB.

Para os ensaios de calorimetria, as vesículas grandes também foram preparadas em solução aquosa de 4 mM Na_2HPO_4 e a concentração de DODAB foi determinada conforme descrito acima.

3.3.3- Determinação de transição de fase de bicamadas de DODAB por DSC

Sob efeito de temperatura, bicamadas lipídicas podem sofrer transição reversível de uma fase gel (mais ordenada) para uma fase líquido-cristalina (mais fluida), em que as cadeias carbônicas ocupam volume total maior. Esse processo é caracterizado por uma temperatura de transição de fase (T_m) e por uma entalpia de transição (ΔH). T_m é rigorosamente definida como o ponto médio entre as temperaturas em que a transição começa e termina (Lee, 1977). Entretanto, para eventos térmicos com transições amplas, T_m é usualmente descrito como a temperatura em que o pico endotérmico atinge um máximo (Mason, 1998), e essa definição é utilizada aqui. Por sua vez, ΔH corresponde à medida de mudança de entalpia por molécula, e reflete a diferença de energia entre as fases gel e líquido-cristalina (Mason, 1998).

T_m e ΔH de bicamadas de DODAB na presença de NaCl, Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) foram obtidas através da técnica de calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) utilizando um microcalorímetro VP-DSC (Microcal Inc.). Nessa técnica, o equipamento mede a potência requerida para manter iguais

as temperaturas das celas contendo a amostra e a referência (solvente) enquanto a temperatura é aumentada ou diminuída a uma taxa constante. A diferença de potência é proporcional ao excesso de capacidade calorífica (ΔC_p), que é registrada continuamente em função da temperatura. ΔC_p reflete a diferença de capacidade calorífica que surge de processos energéticos internos das moléculas da amostra (Mason, 1998).

Amostras de 2mM DODAB BF preparadas em água foram incubadas por 24 horas com 2 ou 100mM NaCl; 2 ou 4mM Na_2HPO_4 ; 2 ou 4mM dAMP e 0,04 ou 1mM poli(dA). Após essa incubação, 0,5mL das amostras foram injetadas no microcalorímetro, cuja cela de referência estava preenchida com água, e foram então aquecidas a uma taxa de 20°C/h no intervalo entre 20°C e 60°C. Os dados obtidos foram tratados com o software Origin versão 7.0 (Microcal Inc.). Dos dados brutos foi subtraída a varredura água-água realizada imediatamente antes das medidas com fragmentos. Nessa varredura tanto a cela de amostra quanto a de referência foram preenchidas com água. A curva resultante foi então normalizada para a concentração de DODAB utilizada (2 mM) e em seguida uma linha de base foi criada manualmente e subtraída da curva, gerando um gráfico de excesso de capacidade calorífica (ΔC_p) em função da temperatura (°C). Utilizando-se novamente o software Origin do aparelho foi possível calcular T_m e ΔH como a temperatura do pico endotérmico mais intenso e como a área sob a curva do termograma de ΔC_p em função da temperatura, respectivamente.

Experimentos semelhantes foram realizados com 2mM de vesículas grandes de DODAB preparadas em 4mM Na_2HPO_4 . Também foram realizados experimentos com 0,7mM DODAB LV preparadas em água e deixadas interagindo por 24 horas com 0,27mM poli(dA).

Como controles, os aquecimentos de 2 ou 4mM dAMP e 0,04 ou 1mM poli(dA) em água foram registrados e normalizados para 2mM DODAB a fim de permitir a comparação com as outras amostras. Os resultados mostrados correspondem aos da primeira varredura, e

os ensaios foram feitos com amostras frescas pelo menos duas vezes no laboratório da Profa. M. Teresa Lamy, do Instituto de Física da USP.

3.3.4- Determinação de efeito de eletrólitos sobre turbidez de DODAB BF

Um feixe de luz que incide sobre uma dispersão coloidal pode ser absorvido, espalhado ou transmitido sem alteração através da dispersão (Shaw, 1970). A turbidez derivada do espalhamento de luz pela dispersão coloidal pode ser determinada em espectrofotômetros comuns como uma espécie de pseudo-absorção de luz, ou seja, luz que não chega ao detector do aparelho por ter sido espalhada. A turbidez é útil para acompanhar a estabilidade de dispersões coloidais já que variações de turbidez podem ser relacionadas a fenômenos como agregação, fusão e precipitação de partículas das dispersões (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1986).

A turbidez de 0,5mM de fragmentos de bicamada foi registrada a cada 2 minutos durante 20 minutos e de forma pontual nos tempos de 3 horas e 24 horas após misturá-los com uma série de concentrações de NaCl, Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA) em uma cubeta de quartzo de 0,5mL. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000 com duplo feixe. O branco desses ensaios era uma dispersão de 0,5mM DODAB BF.

3.3.5- Determinação de efeito de eletrólitos sobre tamanho e potencial-zeta de dispersões de DODAB

Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) é uma das técnicas mais úteis e versáteis para medir tamanhos ou distribuições de tamanho de partículas coloidais (Pecora, 2000). Essa técnica se baseia na flutuação de intensidade de luz espalhada pela dispersão ao longo do tempo, que é decorrente do movimento browniano de suas partículas (Pecora, 2000). O diâmetro hidrodinâmico médio (Dz) corresponde ao diâmetro da partícula

mais a espessura da dupla camada elétrica, e daqui por diante será referido apenas como diâmetro médio.

Dz e as distribuições de tamanho das dispersões de DODAB na presença de NaCl, Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA) foram obtidas a partir da técnica de DLS usando um equipamento ZetaPlus Zeta Potential Analyser (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) equipado com um laser de 677nm e um detector de luz a 90° para medidas de tamanho. O correlator temporal do equipamento permite obter a constante de decaimento das flutuações da luz espalhada pela amostra (Γ) e, a partir dela, o coeficiente de difusão translacional (d) segundo a expressão:

$$d = \Gamma / k^2, \quad (\text{equação 1})$$

onde $k = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta/2)$, n é o índice de refração do meio, λ é o comprimento de onda da luz incidente e θ é o ângulo de espalhamento.

Supondo serem esféricas as partículas da dispersão, o seu diâmetro médio (Dz) será relacionado com o coeficiente de difusão (d) pela relação de Stokes-Einstein:

$$Dz = k_b T / 3\pi\eta d, \quad (\text{equação 2})$$

onde k_b é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em kelvin (K) e η é a viscosidade do líquido em que as partículas da dispersão estão se movendo (Pecora, 2000).

As distribuições de tamanho foram obtidas através do ajuste dos dados usando o algoritmo de mínimos quadrados não-negativos (*non-negatively constrained least-squares*, NNLS), que é um método independente de modelo e que permite obter distribuições multimodais (Grabowski e Morrison, 1983). Para essas distribuições, as informações mais importantes são a posição dos picos e a razão das áreas dos picos. A largura relativa das distribuições é dada pela polidispersidade (P), que é adimensional:

$$P = \mu_2 / \Gamma^2, \quad (\text{equação 3})$$

onde μ_2 é proporcional à variância da “intensidade” ponderada da distribuição de coeficientes de difusão.

O equipamento ZetaPlus também é capaz de medir a mobilidade eletroforética das partículas que se movimentam num campo elétrico a partir da mudança de frequência da luz laser espalhada (*electrophoretic light scattering*). Nesse caso, o campo elétrico é gerado por um eletrodo mergulhado na solução de interesse. Conhecendo-se a mobilidade eletroforética (μ) e D_z é possível calcular o potencial de superfície junto ao plano de cisalhamento da partícula, também chamado de potencial-zeta (ζ). Para isso, usa-se a aproximação de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon, \quad (\text{equação 4})$$

onde μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio e ε é a constante dielétrica do meio.

Assim, D_z e as distribuições de tamanho de 0,5mM DODAB BF foram determinados após incubação por 24 horas com as seguintes faixas de concentração de eletrólitos: 0 - 100mM NaCl; 0 - 2,5mM Na_2HPO_4 ; 0 - 2,5mM dAMP e 0 - 0,25mM poli(dA). As mesmas amostras foram utilizadas na determinação do potencial-zeta. As medidas foram realizadas a 25°C e o volume final das amostras era de 2 mL.

Da mesma forma, foram determinados D_z , as distribuições de tamanho e ζ de 0,2mM DODAB LV em presença de 0 - 0,05mM poli(dA).

É importante salientar que os potenciais-zeta de fragmentos de DODAB foram medidos na presença de até 5mM NaCl ou 2,5mM Na_2HPO_4 , uma vez que acima dessas concentrações de sal a condutividade do meio torna-se muito alta, comprometendo não só as medidas mas também o próprio eletrodo, que pode sofrer eletrólise.

3.3.6- Determinação de fusão de bicamadas de DODAB induzida por eletrólitos

A fusão de bicamadas marcadas e não-marcadas com 2-(10-(1-pireno)-decanoil)-fosfatidilcolina (PyPC) resulta numa diluição da sonda dentro da bicamada e num decréscimo da razão de fluorescência do excímero para o monômero (E/M). Excímeros são dímeros de estado excitado formados quando um monômero excitado de pireno se associa a um pireno no estado fundamental. No caso de lipídios que contêm um pireno, a formação de excímero depende da difusão lateral do lipídio (Somerharju, 2002).

Fragmentos de bicamada de DODAB marcados com PyPC foram preparados da seguinte forma: 0,5mL de uma solução clorofórmica de 10mM DODAB contendo 7 mol % da sonda fluorescente PyPC foram evaporados sob fluxo de nitrogênio para formar um filme no fundo do tubo de sonicação. O filme foi seco por 2 horas em uma câmara de vácuo e então 25 mL de água Milli-Q foram adicionados para gerar uma concentração final de lipídios de 0,2 mM. Então, 20 pulsos de ultrassom de 1 minuto cada intercalados por descansos de 1 minuto foram usados para dispersar o filme. O sonicador Fischer Scientific 550 Sonic Dismembrator estava ajustado para 25% de potência. A sonicação em pulsos foi utilizada para evitar superaquecimento da amostra, que poderia provocar hidrólise do pireno ou peroxidação da fosfatidilcolina.

DODAB BF marcados com PyPC numa concentração final de lipídios de 0,2mM foram então misturados com uma dispersão estoque de 2mM DODAB BF não-marcados e o volume foi completado para 100μL com soluções de Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA) para gerar uma concentração final de lipídio de 0,5mM e uma proporção final de fragmentos marcados/não-marcados de 1:10. Depois de 20 minutos de interação, alíquotas de 50μL da mistura foram diluídas para 0,5mL. A diluição serviu para parar a interação entre fragmentos e para eliminar possíveis artefatos devidos ao espalhamento de luz.

Espectros de fluorescência foram então registrados a 30°C utilizando um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 com 344 nm como o comprimento de onda de excitação. Fendas de excitação e emissão eram de 10 e 5 nm, respectivamente. A razão excímero/monômero (E/M) foi medida como a razão de intensidades de fluorescência não corrigidas em 470 e 395nm.

Um estoque de 0,2 mM de vesículas grandes de DODAB marcadas com 7 mol % de PyPC foi preparada como descrito acima, exceto pelo fato de que ao invés de serem sonicados, os 25mL da dispersão foram aquecidos a 60°C por 30 minutos e homogeneizados por agitação do tubo utilizando um “vortex”. DODAB LV marcadas com PyPC numa concentração final de lipídios de 0,2mM foram então misturados com uma dispersão estoque de 2mM DODAB LV não-marcadas e o volume foi completado para 100μL com soluções de poli(dA) para gerar uma concentração final de lipídio de 0,2mM e uma proporção final de vesículas marcadas/não-marcadas de 1:10. Depois de 20 minutos de interação, alíquotas de 50μL da mistura foram diluídas para 0,5mL e os espectros foram registrados utilizando o espectrofluorímetro.

3.3.7- Determinação de espectros de CD de poli(dA) em presença de DODAB BF

As moléculas de DNA apresentam assimetrias que resultam na absorção diferencial de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita, num fenômeno conhecido como dicroísmo circular (*Circular Dichroism*, CD) (Johnson Jr., 1996). O ambiente químico e a ligação de moléculas ao DNA afetam sua estrutura secundária e modificam os espectros de CD (Guschlbauer e Courtois, 1968; Akao *et al.*, 1996; Zuidam *et al.*, 1999), permitindo avaliar a interação entre DNA e DODAB BF do ponto de vista da estrutura do DNA.

Cinéticas de turbidez em 300nm foram feitas com 0,05mM poli(dA) no espectrofotômetro Hitachi. Concentrações de 0,1 a 5 mM de fragmentos de bicamada foram

adicionados ao oligodeoxinucleotídeo e a turbidez foi registrada a cada 2 minutos durante 20 minutos. Os brancos desses ensaios foram soluções de 0,05mM poli(dA). Espectros de Dicroísmo Circular (CD) de 0,05mM poli(dA) foram obtidos na presença de concentrações de DODAB escolhidas com base nas cinéticas de turbidez, em que foram escolhidas as concentrações de fragmentos que geraram o menor aumento de turbidez, i.e., menor espalhamento de luz.

Os espectros de CD de poli(dA) na presença de 0,1; 0,2 e 0,3mM de fragmentos foram obtidos através do espectropolarímetro Jasco-720 imediatamente após misturar poli(dA) e fragmentos de bicamada de DODAB. Foram varridos espectros de 320nm a 190nm através de cela com caminho óptico de 1mm. A velocidade de varredura foi de 20nm/min e cada espectro corresponde à média de cinco espectros acumulados.

Também foram registrados espectros de 0,05mM poli(dA) em água Milli-Q. Foram subtraídas dos espectros as linhas de base correspondentes a espectros de água Milli-Q e de dispersões de DODAB nas mesmas concentrações finais dos respectivos ensaios.

Os espectros foram obtidos na unidade mdeg (miligraus) e convertidos para $[\theta]$ (elipticidade molar) com o auxílio do programa do espectropolarímetro Jasco-720.

3.3.8- Determinação de carga negativa para Na_2HPO_4 e dAMP por potenciometria

O pH de soluções de Na_2HPO_4 e dAMP no intervalo de concentrações de 0 – 2,5 mM foi medido usando o pHmetro DM-22 (Digimed, Brasil). As cargas negativas para cada pH foram calculadas usando a equação de Henderson-Hasselbalch (Kotz e Treichel, 1999). Para o intervalo de pHs medidos, a equação é apropriada para o equilíbrio entre ânions fosfato monovalente e divalente como se segue:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log [\text{HPO}_4^{2-}] / [\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}] \quad (\text{equação 5})$$

Os segundos pK_a s dos ânions fosfato para Na_2HPO_4 e dAMP são 7,21 (Vogel, 1979) e 6,27 (Mucha *et al.*, 2008), respectivamente. Como a concentração de fosfato adicionada é conhecida, a concentração de carga negativa disponível pode ser calculada como a soma das concentrações de ânions fosfato monovalente e divalente multiplicadas por seus respectivos números de valência, i.e., $[carga\ negativa] = 1 \times [H_2PO_4^{1-}] + 2 \times [HPO_4^{2-}]$.

3.3.9- Preparação de soluções-estoque de DODAB BF, BSA e OVA

As soluções estoque de 2mM DODAB BF foram preparados em solução de 1mM NaCl por sonicação em tip, conforme descrito anteriormente. A concentração de DODAB no estoque corresponde à diferença entre a concentração obtida na dosagem realizada pelo método da microtitulação com nitrato de mercúrio (Schales e Schales, 1941) após sonicação e centrifugação e a concentração da solução de NaCl que havia sido dosada previamente.

As proteínas albumina de soro bovino (BSA - Sigma) e ovalbumina (OVA - Sigma) geraram estoques 2mg/mL após solubilização em solução de NaCl 1mM. A concentração de proteínas nos estoques foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A ovalbumina de grau V destinada aos ensaios biológicos foi passada por uma coluna de polimixina B (Pierce Biotechnology, IL, USA) a fim de reduzir o teor de endotoxinas. A concentração de proteínas foi então determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o nível de endotoxina era inferior a 1 EU/mg de proteína como determinado pelo kit de lisado de amebócito *Limulus polyphemus* (Sigma). Cada unidade de endotoxina (EU) corresponde a 0,1ng de lipopolissacarídeo.

Os estoques de proteína foram congelados a $-20^{\circ}C$ na forma de alíquotas de 1mL em tubos Eppendorf, para posterior utilização.

3.3.10- Determinação de Dz, ζ e distribuição de tamanhos de DODAB BF / OVA / CpG

A partir dos estoques preparados, 0,1 mg/mL de OVA foram titulados com 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1mM DODAB BF. Assim que os fragmentos foram adicionados à proteína, os diâmetros foram determinados a cada 5 minutos durante 1 hora e de forma pontual nos tempos de 3 horas e 24 horas. O potencial-zeta de cada preparação foi medido imediatamente após a leitura de 1 hora. Os volumes foram completados com solução de NaCl 1mM para manter a força iônica do meio.

Com base nessa titulação, escolheu-se trabalhar com complexos formados por 0,1mM DODAB BF e 0,1 mg/mL OVA. Assim, 0,1mM DODAB BF foram postos para interagir por 1 hora com 0,1 mg/mL de OVA. Após essa incubação, foram adicionados 1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 μ M de oligodeoxinucleotídeo CpG. Então, os diâmetros foram determinados a cada 5 minutos durante 1 hora e de forma pontual nos tempos de 3 horas e 24 horas. O potencial-zeta de cada preparação foi medido imediatamente após a leitura de 1 hora. Procedimento idêntico foi adotado para os controles sem oligodeoxinucleotídeos, que continham apenas 0,1mM fragmentos ou 0,1mM fragmentos incubados por 1 hora com 0,1 mg/mL de OVA. Os volumes foram completados com solução de NaCl 1mM para manter a força iônica do meio.

3.3.11- Determinação de Dz, ζ e distribuição de tamanhos de DODAB BF / BSA / CpG

A partir dos estoques preparados, 0,1mM DODAB BF foram postos para interagir por 1 hora com 0,1 mg/mL de BSA. Após essa incubação, foram adicionados 1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 μ M de oligodeoxinucleotídeo CpG. Então, os diâmetros foram determinados a cada 5 minutos durante 1 hora e de forma pontual nos tempos de 3 horas e 24 horas. O potencial-zeta de cada preparação foi medido imediatamente após a leitura de 1 hora. Procedimento idêntico foi adotado para os controles sem oligodeoxinucleotídeos, que continham apenas 0,1mM

fragmentos ou 0,1mM fragmentos incubados por 1 hora com 0,1 mg/mL de BSA. Os volumes foram completados com solução de NaCl 1mM para manter a força iônica do meio.

3.3.12- Determinação de Dz, ζ e distribuição de tamanhos de $\text{Al}(\text{OH})_3$ / OVA / CpG

$\text{Al}(\text{OH})_3$ foi diluído a partir de uma solução estoque 61,5mg/mL até a concentração final de 0,1 mg/mL em uma solução de 1mM NaCl e teve imediatamente Dz e ζ determinados através do ZetaPlus Zeta Potential Analyser, conforme descrito anteriormente.

Procedimento análogo foi adotado para determinar Dz, ζ e a distribuição de tamanhos de $\text{Al}(\text{OH})_3$ 0,1mg/mL na presença de: OVA 0,1mg/mL; CpG 1 μ M; CpG 20 μ M; OVA 0,1mg/mL e CpG 1 μ M; e OVA 0,1mg/mL e CpG 20 μ M. Os volumes foram completados com solução de NaCl 1mM.

3.3.13- Descrição do esquema de imunização

Os experimentos com uso de cobaias foram realizados no laboratório da Dra. Eliana Faquim-Mauro, no Instituto Butantan, e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (Protocolo n° 499/08).

Imunização subcutânea na base da cauda (0,2 mL/animal) foi realizada separadamente para grupos de 5 camundongos BALB/c conforme o esquema abaixo:

Tabela 3- Esquema de imunização dos camundongos.

Grupo	DODAB (mM)	OVA (mg/mL)	CpG (mM)	Al(OH) ₃ (mg/mL)
Naive	-	-	-	-
OVA	-	0,1	-	-
DODAB BF	0,1	-	-	-
CpG 1 μ M	-	-	0,001	-
CpG 20 μ M	-	-	0,02	-
DODAB BF / OVA	0,1	0,1	-	-
DODAB BF / OVA / CpG 1 μ M	0,1	0,1	0,001	-
DODAB BF / OVA / CpG 20 μ M	0,1	0,1	0,02	-
DODAB BF / CpG 1 μ M	0,1	-	0,001	-
DODAB BF / CpG 20 μ M	0,1	-	0,02	-
OVA / CpG 1 μ M	-	0,1	0,001	-
OVA / CpG 20 μ M	-	0,1	0,02	-
Al(OH) ₃	-	-	-	0,1
OVA / Al(OH) ₃	-	0,1	-	0,1
OVA / Al(OH) ₃ / CpG 1 μ M	-	0,1	0,001	0,1
OVA / Al(OH) ₃ / CpG 20 μ M	-	0,1	0,02	0,1
Al(OH) ₃ / CpG 1 μ M	-	-	0,001	0,1
Al(OH) ₃ / CpG 20 μ M	-	-	0,02	0,1

3.3.14- Determinação de reação de hipersensibilidade tardia por inchamento do coxim patelar

A hipersensibilidade de tipo tardio (*Delayed-type Hypersensitivity*, DTH) é uma importante manifestação *in vivo* de imunidade celular resultante de imunização efetiva contra um antígeno, sendo comumente usada para caracterizar a resposta imune celular (Hilgers e Snippe, 1992; Abbas et al, 2000). Nesse ensaio, ativação de macrófagos e inflamação mediadas por células T causam inchaço local (Abbas *et al.*, 2000).

Para avaliação de DTH, o teste de inchamento de pata foi realizado como descrito anteriormente (Macedo *et al.*, 1998). No quinto dia após imunização subcutânea, todos os grupos de camundongos foram desafiados com a injeção de 30µL de 2µg/µL OVA agregada na pata esquerda e o mesmo volume de salina na pata direita. A OVA agregada foi preparada pelo aquecimento de uma solução de proteína em salina por 1 hora a 80°C. A reação de DTH foi monitorada 24 horas depois do desafio usando um paquímetro eletrônico (Starrett Co., MA, USA) e expressa como o aumento em espessura relativa à pata injetada com salina. Os resultados foram expressos como a média aritmética $\pm$ erro padrão da média.

3.3.15- Determinação de resposta humoral (IgG1 e IgG2a) OVA-específica

Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) é uma técnica muito utilizada para quantificar antígenos, anticorpos ou citocinas (Abbas *et al.*, 2000). No caso da dosagem de anticorpos específicos presentes no soro, o antígeno é diretamente ligado à superfície de poços de placas de poliestireno e diluições seriais do soro são então adicionadas. Após lavagem para retirar anticorpos não ligados ao antígeno, é adicionado um anticorpo secundário capaz de se ligar especificamente aos anticorpos do soro. Esse anticorpo secundário está ligado a uma enzima capaz de converter um substrato incolor em um produto colorido que pode ser dosado com o auxílio de um

espectrofotômetro. Para comparar diferentes amostras, escolhe-se uma mesma diluição de soro: quanto mais colorido o ensaio, mais anticorpo específico contra o antígeno está presente no soro.

Assim, para avaliar a resposta humoral decorrente da imunização com diferentes preparações, cinco camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico 14, 21, 28 e 35 dias após a imunização e o soro de cada camundongo foi individualmente analisado por ELISA. De forma sucinta, 96 poços de placas de poliestireno foram cobertos com 100µL de uma solução de 10µg/mL OVA em 0,01M tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,2) e incubados “overnight” a 4°C. Depois de lavar as placas com PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBST), os poços foram bloqueados com 3% gelatina em PBS e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Depois das lavagens com PBST, 100µL de amostras de soro diluídas 1:128 para IgG1 e 1:32 para IgG2a foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37°C por 1 hora. Os anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA foram revelados por incubação (1 hora) das placas com 100µL anticorpos monoclonais anti-IgG1 (1:1000) ou IgG2a (1:500) de cabra marcados com biotina. Em seguida, foram incubados com 100µL de conjugado de estreptoavidina-peroxidase (1:6000) por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada com a adição de 100µL de solução do substrato orto-fenilenodiamina (1mg/mL OPD em 0,1M tampão citrato-fosfato, pH 5,0). Depois de 15 minutos, a reação foi paralisada com 50µL de 2M H₂SO₄ e a densidade óptica foi determinada em 492nm por um leitor automático de placas de ELISA (Electron Corporation, Shanghai, PRC). Os resultados foram expressos como a média das densidades ópticas (ODs) de amostras individuais de soro para detecção de IgG1 e IgG2a ± desvio padrão.

3.3.16-Determinação de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-13) secretadas por células de linfonodo em cultura

Para dosar as citocinas secretadas por células dos linfonodos, foi utilizada uma versão de ELISA conhecida como ensaio sanduíche. Esse ensaio usa dois anticorpos diferentes capazes de reconhecer a citocina cuja concentração deve ser medida. Uma quantidade fixa de um anticorpo é ligada aos poços de placas plásticas de microtitulação. Soluções teste contendo a citocina em uma concentração desconhecida ou uma série de soluções padrão com concentrações conhecidas de citocina são então adicionadas aos poços. Após um período de incubação, as citocinas não ligadas aos anticorpos são removidas por lavagem e o segundo anticorpo, que é ligado a uma enzima, é adicionado. A citocina serve como ponte, de forma que quanto mais citocina presente mais anticorpo secundário irá se ligar. Após revelação do ensaio enzimático, os resultados das soluções padrão são usados para construir uma curva de ligação do anticorpo secundário em função da concentração de citocina, a partir da qual as quantidades de citocina nas soluções teste podem ser inferidas. Nesse tipo de ensaio é essencial que o par de anticorpos reconheça porções diferentes das citocinas, caso contrário o anticorpo secundário não pode se ligar (Abbas *et al.*, 2000).

Assim, seis dias após a imunização, linfonodos inguinais e periaórticos de cinco camundongos foram coletados e usados para preparar soluções celulares em RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) suplementado com 10 mM HEPES, 0,05mM 2-mercaptoetanol, 216 mg de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino (meio RPMI completo). As suspensões celulares (12×10^6 células/mL) foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 poços (Costa, Cambridge, MA) e incubados com meio contendo OVA (250 μ g/mL) em uma atmosfera com 90% de umidade e 5% CO₂ a 37°C por 48 horas. Poços contendo apenas meio ou 2,5 μ g/mL de ConA (Sigma) foram incluídos em todos os experimentos como controles negativo e positivo, respectivamente. Depois dessas 48 horas de incubação, as

placas foram centrifugadas por 8 minutos a 500xg e os sobrenadantes coletados para determinação do conteúdo de citocinas. Os níveis de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-13) nos sobrenadantes foram ensaiados por ELISA sanduíche usando os seguintes anticorpos monoclonais: XMG1.2 e AN18 biotinilado para IFN- γ ; MAB419 e BAF419 biotinilado para IL-12; MAB417 e BAF417 biotinilado para IL-10 e MAB413 e BAF413 biotinilado para IL-13, de acordo com a instrução do fabricante (R&D Systems, Inc., MN, USA). A ligação de anticorpos biotinilados foi determinada usando conjugado estreptoavidina-peroxidase e solução de OPD em tampão citrato-fosfato mais peróxido de hidrogênio. A reação foi paralisada com H₂SO₄ e as placas foram lidas (492nm) em um leitor automático de ELISA. A concentração de cada citocina nos sobrenadantes foi determinada por comparação com curvas padrão de citocinas recombinantes purificadas e os valores expressos em ng/mL. Os limites de detecção foram 0,062 ng/mL para IFN- γ e IL-10; 0,125 ng/mL para IL-12 e 0,156 ng/mL para IL-13. Os resultados foram expressos como a média de dois ensaios distintos $\pm$ desvio padrão.

3.3.17- Análise estatística da significância das respostas imunológicas

Os diferentes grupos experimentais foram comparados através de análise de variância de dois fatores (*Two-way* ANOVA) seguida pelo teste de Tukey de comparações múltiplas. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4- Resultados e Discussão

4.1- Efeito de Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) sobre a estabilidade coloidal de fragmentos de bicamada de DODAB

A estabilidade coloidal de fragmentos de bicamada de DODAB (DODAB BF) em presença de Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) foi investigada através de ensaios de turbidimetria, de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação de diâmetro médio (Dz) e potencial-zeta (ζ) e de fluorescência de PyPC para determinação da fusão de bicamadas.

A turbidez de 0,5mM DODAB BF em 300nm aumenta com o tempo em presença de concentrações de Na_2HPO_4 maiores do que 0,5mM (Figura 7A). Em contraste, dAMP não afetou a turbidez na mesma faixa de concentrações testada para Na_2HPO_4 (Figura 7B).

Em presença de poli(dA), as cinéticas de turbidez apresentam um comportamento não-monotônico: a turbidez aumenta de forma rápida e intensa com a adição de até 0,05mM poli(dA), atingindo uma turbidez máxima por volta de 2,0 (Figura 7C). Para concentrações de poli(dA) maiores, o aumento de turbidez não é tão intenso e permanece estável por volta de 0,9 para 0,25mM e 0,5mM poli(dA), que foram as maiores concentrações testadas (Figura 7C). Isso sugere que em concentrações superiores a 0,05mM o oligodeoxinucleotídeo é capaz de estabilizar o sistema, uma vez que a magnitude do aumento de turbidez diminui.

Os diâmetros médios dos fragmentos diminuíram com a adição de até 0,25mM Na_2HPO_4 e aumentaram com a adição de concentrações de Na_2HPO_4 maiores do que 0,5mM (Figura 8A), o que está de acordo com o observado nas cinéticas de turbidez (Figura 7A). Os potenciais-zeta decresceram bastante com a adição de até 0,25mM Na_2HPO_4 e mantiveram-se baixos e aproximadamente constantes em 20mV a partir de 0,5mM Na_2HPO_4 (Figura 8D). A diminuição do potencial-zeta com o aumento de concentração de Na_2HPO_4 mostra que o sal é capaz de blindar as cargas das cabeças positivas de DODAB. Isso causa uma diminuição da repulsão eletrostática entre os fragmentos de bicamada, permitindo sua agregação ou fusão,

Figura 7- Cinéticas de turbidez em 300 nm para 0,5 mM fragmentos de bicamada de DODAB em presença de Na_2HPO_4 (A), dAMP (B) ou poli(dA) (C). Concentrações de Na_2HPO_4 e dAMP em (A) e (B) são, respectivamente, 0,05 (■); 0,1 (○); 0,25 (▲); 0,5 (▽); 1 (◆); e 2,5mM (◁). Em (C), concentrações de poli(dA) são 0,005 (■); 0,01 (○); 0,025 (▲); 0,05 (▽); 0,1 (◆); 0,25 (◁) e 0,5mM (►). Brancos são 0,5 mM DODAB BF.

Figura 8- Efeito das concentrações de Na_2HPO_4 , dAMP e poli(dA) sobre o diâmetro médio (A, B, C) e o potencial-zeta (D, E, F) de 0,5 mM DODAB BF. As concentrações de Na_2HPO_4 e dAMP são 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2,5 mM. As concentrações de poli(dA) são 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,175 e 0,25 mM.

fato que explicaria o aumento de turbidez e diâmetro (Figuras 7A e 8A).

Por outro lado, adição de dAMP causa a diminuição tanto de D_z quanto de ζ , que atingem patamares mínimos a partir de 1mM dAMP (Figuras 8B e E). dAMP é capaz de blindar as cargas positivas dos fragmentos de bicamada, mas é menos eficiente do que Na_2HPO_4 para reduzir o potencial-zeta dos fragmentos, já que o decréscimo de potenciais-zeta provocado por Na_2HPO_4 é cerca de 10mV mais intenso do que aquele provocado por dAMP para uma mesma faixa de concentrações (Figuras 8D e E). De forma similar, a diminuição de diâmetros e as cinéticas de turbidez mostram que dAMP é incapaz de induzir agregação ou fusão de fragmentos de bicamada (Figuras 7B e 8B).

A diminuição dos diâmetros médios observada com adição de dAMP pode estar relacionada com a blindagem das cargas positivas dos fragmentos de bicamada pelo nucleotídeo: a diminuição na repulsão eletrostática causada pela blindagem de cargas em

baixa força iônica permitiria uma movimentação mais rápida dos fragmentos em solução e conseqüentemente os fragmentos seriam percebidos como partículas menores espalhando luz. Isso ocorre porque os diâmetros médios resultantes do espalhamento de luz dinâmico são calculados a partir da difusividade utilizando a equação de Stokes-Einstein, que não leva em consideração efeitos da camada elétrica difusa resultantes da carga superficial e da nuvem iônica. De fato, a incorporação de efeitos da camada difusa na análise reduz a dependência da força iônica na determinação do diâmetro de partículas coloidais (Gittings e Saville, 1998). Da mesma forma, os tamanhos de DODAB BF em presença de concentrações de Na_2HPO_4 menores do que 0,25mM também diminuem (Figura 8A).

Na presença de poli(dA), os diâmetros médios aumentam até atingir um máximo na presença de 0,05mM poli(dA) e diminuem em concentrações maiores (Figura 8C). O aumento de diâmetro é acompanhado por uma diminuição do potencial-zeta (Figura 8F); o diâmetro atinge um máximo na mesma concentração em que o potencial-zeta está no seu mínimo e para concentrações de poli(dA) maiores do que 0,05mM os potenciais-zeta são negativos (Figura 8F). Esse tipo de fenômeno, em que neutralização de cargas induz flocculação e supercompensação de cargas leva à reestabilização coloidal por repulsão eletrostática, é comum para polieletrólitos interagindo com partículas de carga oposta (Kabanov e Yaroslavov, 2002; Correia *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2005; Sybachin *et al.*, 2007), e também explicaria o comportamento não-monotônico observado nas cinéticas de turbidez (Figura 7C).

É interessante observar que os diâmetros na região de supercompensação de cargas são aproximadamente o dobro daqueles para DODAB BF em água pura (Figura 8C) e que a turbidez nessa região não retorna aos valores iniciais (Figura 7C). Sennato e colaboradores (2005) descreveram um comportamento similar para moléculas longas de DNA simples-fita interagindo com vesículas catiônicas na fase líquido-cristalina do lipídio catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP): na região de supercompensação de cargas os

diâmetros das partículas também dobraram de tamanho. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) sugerem agregação ao invés de fusão de vesículas (Sennato *et al.*, 2005). Por outro lado, a interação entre um polímero catiônico e pequenas vesículas aniônicas no estado gel levaram à fusão, já que os agregados surgidos da complexação polímero catiônico / vesículas aniônicas não se dissociaram em presença de sal ou poliânion (Yaroslavov *et al.*, 2002; Yaroslavov *et al.*, 2008).

Como mencionado, a cinética de turbidez mais rápida e intensa e a neutralização de cargas de 0,5mM DODAB BF ocorreu em presença de 0,05mM poli(dA) (Figuras 7C e 8F), isto é, numa proporção molar de 1:10 poli(dA):DODAB. Nessa condição experimental, uma molécula de poli(dA) está adsorvida a 10 moléculas de DODAB dos fragmentos de bicamada. Como cada molécula de poli(dA) possui 10 fosfatos negativamente carregados em sua estrutura, ele deveria ser capaz de neutralizar 10 moléculas de DODAB na superfície dos fragmentos, como observado. Essa proporção de neutralização é consistente com uma estrutura de fragmentos de bicamada em que as duas monocamadas estão expostas para o meio (Pansu *et al.*, 1990), ao invés de uma estrutura de pequenas vesículas prolatas que é proposta por alguns grupos (Saveyn *et al.*, 2007). Nesse último caso, a proporção molar necessária para obter neutralização de cargas seria de 1:20 poli(dA):DODAB, já que apenas moléculas de DODAB da monocamada externa seriam capazes de se ligar ao oligodeoxinucleotídeo.

Para verificar se há diferenças na interação entre oligodeoxinucleotídeo e fragmentos de bicamada ou vesículas grandes de DODAB (DODAB LV), os diâmetros médios e potenciais-zeta de 0,2mM DODAB LV foram determinados em presença de uma faixa de concentrações de poli(dA) (Figura 9).

Figura 9- Efeito da concentração de poli(dA) sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) de 0,2 mM vesículas grandes de DODAB. As concentrações de poli(dA) são 0,002; 0,004; 0,006; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mM.

Os diâmetros médios das vesículas grandes aumentam com a concentração de oligodeoxinucleotídeo até atingir um máximo na presença de 0,01mM poli(dA) (Figura 9A). Para concentrações maiores de poli(dA), os diâmetros diminuem até um patamar cerca de 100nm maior do que o observado para DODAB LV em água pura (Figura 9A). O aumento de diâmetro é acompanhado de uma diminuição do potencial-zeta, que atinge um mínimo em 0,01mM poli(dA) (Figura 9B). Acima dessa concentração, os potenciais-zeta são negativos e

os diâmetros sofrem uma diminuição (Figuras 9A e B). Esse comportamento é muito semelhante ao observado para fragmentos de bicamada interagindo com oligodeoxinucleotídeo (Figuras 8C e F). Novamente, a neutralização de cargas superficiais das partículas pelo polieletrólito leva à floculação e a supercompensação de cargas leva à reestabilização coloidal por repulsão eletrostática. A neutralização das cargas superficiais de 0,2mM DODAB LV ocorre em presença de 0,01mM poli(dA), ou seja, numa proporção molar de 1:20 poli(dA):DODAB. Isso corrobora a idéia de que os fragmentos de bicamada, ao contrário das vesículas grandes, possuem as duas monocamadas expostas para o meio.

As Figuras 10, 11 e 12 mostram as distribuições de tamanho para fragmentos de bicamada de DODAB em água pura e em presença de algumas concentrações de Na_2HPO_4 , dAMP e poli(dA), respectivamente. É possível observar que em presença Na_2HPO_4 as distribuições são deslocadas para diâmetros maiores, sugerindo agregação ou fusão de fragmentos de bicamada (Figura 10). Por outro lado, as mesmas concentrações de dAMP provocam um deslocamento das distribuições para diâmetros menores, que corresponderiam aos diâmetros de fragmentos se movimentando mais livremente em solução devido à diminuição de repulsão eletrostática provocada pela blindagem de cargas superficiais em baixa força iônica (Figura 11).

Na concentração de poli(dA) em que ocorre a neutralização de cargas, observa-se um grande deslocamento das distribuições de tamanho para diâmetros maiores (Figura 12B). Já em presença de concentração de poli(dA) em que ocorre supercompensação de cargas, observa-se um deslocamento das distribuições para diâmetros menores que, entretanto, ainda são maiores do que aqueles observados para fragmentos em água pura (Figuras 12A e C).

Figura 10 - Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5mM (B) ou 2,5mM Na_2HPO_4 (C). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

Figura 11- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5 mM (B) ou 2,5mM dAMP (C). Os números dentro dos gráficos correspondem ao pico mais intenso de cada distribuição.

Figura 12- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,05 mM (B) ou 0,25 mM poli(dA) (C). Os números dentro dos gráficos correspondem ao pico mais intenso de cada distribuição.

De forma semelhante, as distribuições de tamanho de DODAB LV são deslocadas para diâmetros maiores em presença de concentração de poli(dA) suficiente para neutralizar as cargas (Figura 13B). Nesse caso, a distribuição multimodal de diâmetros apresenta um número maior de grupos de picos, sugerindo um aumento de polidispersidade do sistema

(Figura 13B). Para concentração de poli(dA) em que ocorre supercompensação de cargas, observa-se um deslocamento das distribuições para diâmetros menores que, entretanto, ainda são maiores que aqueles observados para fragmentos em água pura (Figuras 13A e C).

Figura 13- Distribuições de tamanho para 0,2mM DODAB LV em água (A) ou em presença de 0,01mM (B) ou 0,05mM poli(dA) (C). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

Além disso, a distribuição multimodal volta apresentar menos picos, sugerindo uma diminuição da polidispersidade quando comparada com a que ocorre na neutralização de cargas (Figuras 13B e C). É importante destacar que o efeito de reestabilização coloidal

observado em presença de oligodeoxinucleotídeo não ocorre em presença dos eletrólitos Na_2HPO_4 e dAMP (Figuras 10, 11, 12 e 13).

A fim de discriminar se o aumento de turbidez e diâmetro médio induzido pelos eletrólitos era devido a agregação ou fusão de DODAB BF, foram realizados ensaios utilizando a sonda fluorescente PyPC. A fusão de bicamadas marcadas e não-marcadas com PyPC resulta numa diluição da sonda dentro da bicamada e num decréscimo da razão de fluorescência do excímero para o monômero (E/M). Esse método tem sido frequentemente empregado para caracterizar a ação de agentes fusogênicos sobre vesículas de lecitina, de DODAB ou miméticas de mitocôndrias (Schenkman *et al.*, 1981, Carmona-Ribeiro *et al.*, 1985, Kawai *et al.*, 2005). A Figura 14 mostra que não existe troca espontânea de PyPC entre fragmentos marcados e não marcados e que a razão de fluorescência não se altera com a diluição da sonda, uma vez que E/M se mantém constante ao longo do tempo.

Figura 14- Razão excímero-monômero (E/M) de PyPC em DODAB BF (marcado/não-marcado = 1:10) em função do tempo antes (■) e depois (□) da diluição de 10 vezes. DODAB BF marcado continha 7 mol % PyPC. Razão E/M corresponde à razão de emissão de fluorescência em 470nm / 395nm.

Assim, DODAB BF marcados e não-marcados com PyPC foram incubados com diferentes concentrações de Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas 10 vezes e os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos (Figura 15).

E/M diminuiu em função da concentração de Na_2HPO_4 (Figura 15A). Essa diminuição é mais intensa a partir de 0,05mM Na_2HPO_4 e atinge um patamar mínimo a partir de 0,175mM Na_2HPO_4 (Figuras 15A e B). Isso prova que os aumentos de turbidez e de diâmetro médio são resultantes de fusão induzida por Na_2HPO_4 (Figuras 7A e 8A). Por outro lado, nenhuma mudança significativa de E/M é observada após adição de dAMP (Figuras 15C e D). Isso mostra que dAMP não causa fusão de fragmentos em nenhuma concentração testada, em concordância com as cinéticas de turbidez e com a determinação de Dz (Figuras 7B e 8B).

Os espectros de fluorescência e a razão E/M foram muito afetados pela adição de poli(dA) (Figuras 15E e F). E/M diminuiu intensamente com a adição de até 0,005mM poli(dA), atingindo um patamar mínimo a partir dessa concentração de oligodeoxinucleotídeo (Figura 15F). Isso mostra que o aumento de turbidez e de diâmetro médio observado com a adição de poli(dA) é resultado da fusão de fragmentos de bicamada de DODAB induzida pelo oligodeoxinucleotídeo (Figuras 7C e 8C). É possível concluir que poli(dA) é mais eficiente do que Na_2HPO_4 para induzir fusão de fragmentos de bicamada, uma vez que a fusão ocorre na presença de concentrações muito menores de oligodeoxinucleotídeo (Figuras 15B e F). Também é interessante o fato de que, para concentrações equivalentes de carga, DNA na forma de polímero (oligodeoxinucleotídeo) é capaz de induzir fusão enquanto que na forma de monômero (nucleotídeo) não é (Figuras 15D e F). Isso sugere que o efeito de repetição de cargas numa molécula (polieletrólito) é importante para o controle da estabilidade coloidal.

Figura 15- Efeito da concentração de Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) sobre os espectros de fluorescência de PyPC em fragmentos de bicamada de DODAB (A, C, E) ou sobre a razão excímero-monômero (B, D, F). O comprimento de onda de excitação era de 344nm. A concentração final de DODAB era 0,05 mM. DODAB BF marcados continham 7 mol % de PyPC. DODAB BF marcados e não marcados foram misturados na proporção 1:10. Após interagirem por 20 minutos com Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA), as dispersões foram diluídas 10 vezes para aquisição dos espectros. A razão excímero-monômero (E/M) corresponde à razão de intensidades de fluorescência em 470 nm / 395 nm.

Para poli(dA), é importante destacar que E/M mínima, isto é, fusão máxima, ocorre a partir do ponto de neutralização de cargas (0,05mM DODAB BF e 0,005mM poli(dA)) e se estende na forma de patamar mínimo pela região de supercompensação de cargas, em que concentrações de poli(dA) maiores do que 0,005mM resultam em arranjos com cargas negativas. Isso mostra que as partículas coloidalmente estáveis e com diâmetro médio maior observadas nessa região são resultado da fusão de fragmentos de bicamada induzida por poli(dA) (Figuras 8C e 15F). Isso está de acordo com a observação comentada anteriormente de que polycations induzem a fusão de pequenas vesículas aniônicas no estado gel produzindo estruturas coloidalmente estáveis (Yaroslavov *et al.*, 2002; Yaroslavov *et al.*, 2008).

Ensaio de fluorescência de PyPC para vesículas grandes de DODAB em presença de poli(dA) são muito semelhantes àqueles com fragmentos de bicamada de DODAB (Figura 16). A razão E/M diminui substancialmente com a adição de concentrações pequenas de poli(dA) e atinge um patamar mínimo a partir de 0,001mM poli(dA) (Figuras 16A e B).

Novamente, a fusão máxima ocorre a partir do ponto de neutralização de cargas (0,02mM DODAB LV e 0,001mM poli(dA)) e se estende na forma de patamar mínimo pela região de supercompensação de cargas (Figura 16B).

Figura 16- Efeito da concentração de poli(dA) sobre os espectros de fluorescência de PyPC em vesículas grandes de DODAB (A) e sobre a razão excímero-monômero (B). O comprimento de onda de excitação era de 344nm. A concentração final de DODAB era 0,02 mM. DODAB LV marcadas continham 7 mol % de PyPC. DODAB LV marcadas e não marcadas foram misturadas na proporção 1:10. Após interagirem por 20 minutos com poli(dA), as dispersões foram diluídas 10 vezes para aquisição dos espectros. A razão excímero-monômero (E/M) corresponde à razão de intensidades de fluorescência em 470 nm / 395 nm.

4.2- Efeito de Na_2HPO_4 , dAMP ou poli(dA) sobre a transição de fase de fragmentos de bicamada de DODAB

Os parâmetros termodinâmicos associados com a transição de fase gel (mais ordenada) para líquido-cristalina (mais fluida), como a temperatura de transição de fase (T_m) e a entalpia de transição (ΔH), podem ser determinados por calorimetria diferencial de varredura – DSC (Mason, 1998). A transição de fase pode ser facilitada pela ação conjunta das moléculas de lipídios da bicamada, i.e., pode ser um processo cooperativo. A cooperatividade da transição está relacionada ao intervalo de temperatura em que ela ocorre, de forma que quanto menor o intervalo mais cooperativo é o processo (Lee, 1977). Esse é o caso das transições de bicamadas de vesículas grandes de DODAB, que são caracterizadas por picos de absorção de calor bem definidos (Blandamer *et al.*, 1992; Cocquyt *et al.*, 2005).

As vesículas grandes apresentam um pico definido e intenso em 44,7°C, que corresponde à transição de fase gel para líquido-cristalina, e um pico menos intenso em 36,1°C que corresponde a uma pré-transição (Figura 17A). A pré-transição depende do histórico da amostra e tem sido atribuída a um estiramento das cadeias de alquil acompanhado de perda de desordem rotacional (Saveyn *et al.*, 2009).

Figura 17- Termogramas de dispersões de 2 mM DODAB. Fragmentos de bicamada ou vesículas grandes de DODAB em água pura (A); fragmentos de bicamada em presença de 2 mM (B) ou 4 mM Na_2HPO_4 (C) e fragmentos de bicamada ou vesículas grandes em presença de 4 mM Na_2HPO_4 (D).

Por outro lado, os fragmentos de bicamada de DODAB apresentam transição de fase em intervalo de temperatura amplo, entre 30 e 45°C, com picos em 36°C e 43,7°C (Figura 17A). Isso denota baixa cooperatividade no processo de transição (Cocquyt *et al.*, 2004), que

pode ser explicada pelo fato de as moléculas de lipídios próximas às bordas dos fragmentos estarem menos empacotadas do que as do centro dos fragmentos, que estão em fase gel (Vieira *et al.*, 2006). De fato, abordagens baseadas em ressonância eletrônica de spin e ressonância magnética nuclear (ESR e NMR) mostram que há coexistência de duas fases em DODAB BF e que apenas 50% dos lipídios de DODAB BF encontram-se em fase gel (Benatti *et al.*, 2001; Cocquyt *et al.*, 2004).

As temperaturas de transição de fase e entalpias de transição para vesículas e fragmentos de bicamada de DODAB encontram-se na Tabela 4. Esses resultados para dispersões de DODAB em água estão de acordo com dados já reportados (Nascimento *et al.*, 1998; Brito e Marques, 2005; Cocquyt *et al.*, 2005). As T_m para vesículas e fragmentos são parecidas, mas o valor de ΔH de fragmentos é cerca de 50% daquele observado em vesículas (Tabela 4), o que é coerente com a observação de que a sonicação reduz em cerca de 50% a população de moléculas na fase gel. Considerando que o método de preparo da amostra e a taxa de varredura afetam o resultado (Feitosa *et al.*, 2000), foi escolhida a taxa de aquecimento de 20°C/hora, considerada a máxima recomendável para varredura de bicamadas de fosfolipídios (Mason, 1998).

Em presença de Na_2HPO_4 (Figuras 17B e C), a transição de fase de fragmentos de bicamada de DODAB apresenta picos definidos similares àqueles de vesículas grandes em água (Figura 17A). Para DODAB BF em presença de 2mM Na_2HPO_4 há um pico intenso em 48,9°C (Figura 17B); em presença de 4mM Na_2HPO_4 há um pico intenso em 50,6°C (Figura 17C). ΔH para DODAB BF em presença de 2 ou 4mM Na_2HPO_4 também são similares àquelas observadas para DODAB LV em água (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito de Na_2HPO_4 , dAMP e poli(dA) sobre as temperaturas de transição de fase (T_m) e as entalpias de transição (ΔH) de dispersões de 2mM DODAB preparadas em água. s.d. é o desvio padrão da média.

Dispersão de DODAB	Tipo de eletrólito	Concentração de eletrólito (mM)	Intervalo de temperaturas para cálculo de ΔH ($^{\circ}\text{C}$)	$T_m \pm \text{s.d.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H \pm \text{s.d.}$ (kcal/mol)
LV	—	—	42 – 45	$44,7 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,5$
LV	Na_2HPO_4	4,00	30 – 55	$50,5 \pm 0,1$	$18,0 \pm 0,2$
BF	—	—	30 – 45	$43,7 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$
BF	Na_2HPO_4	2,00	40 – 55	$48,9 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,1$
BF	Na_2HPO_4	4,00	35 – 55	$50,7 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,5$
BF	dAMP	2,00	30 – 47	$45,3 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$
BF	dAMP	4,00	30 – 47	$45,3 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,2$
BF	poli(dA)	0,04	30 – 55	$43,6 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$
BF	poli(dA)	1,00	35 – 55	$53,4 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,3$

Uma transição de fase estreita, com picos definidos e com T_m e ΔH elevadas mostra que Na_2HPO_4 é capaz de induzir a formação de grande superfície de bicamada empacotada e com transição cooperativa. Isso é resultado da fusão de fragmentos de bicamada induzida por sal, uma vez que nas proporções molares de 1:1 e 2:1 Na_2HPO_4 :DODAB já são observados aumento de turbidez e de diâmetros médios e queda da razão E/M (Figuras 7A, 8A e 15B). De fato, os termogramas de DODAB BF e LV em presença de 4mM Na_2HPO_4 são muito semelhantes, apresentando um pico em $50,6^{\circ}\text{C}$ (Figura 17D). A T_m mais elevada para bicamadas de DODAB na presença de Na_2HPO_4 quando comparada a de vesículas grandes em água pura (Tabela 4) pode ser atribuída a um aumento do empacotamento da bicamada provocado pela blindagem das cargas positivas das cabeças de DODAB, como já foi descrito para vesículas grandes de DODAB em presença de NaCl (Benatti *et al.*, 2007). Apesar de DODAB BF e LV apresentarem T_m similares em presença de 4mM Na_2HPO_4 (Tabela 4), ΔH para vesículas é cerca de 30% maior do que para fragmentos nessa condição (Tabela 4). Isso está relacionado ao fato de que nesse caso o perfil de transição de vesículas é mais largo do que o de fragmentos (Figura 17D) e pode refletir pequenas diferenças de organização da

bicamada entre vesículas preparadas por aquecimento de pó de DODAB em solução salina e vesículas formadas por fusão de fragmentos.

É interessante observar que apesar de o valor de ΔH aumentar com o aumento de concentração de Na_2HPO_4 (Tabela 4), o pico de transição em presença de 4mM Na_2HPO_4 é mais largo e menos intenso do que aquele em presença de 2mM Na_2HPO_4 (Figuras 17B e C). Esse fenômeno também ocorre com vesículas grandes (Figura 17D) e pode ser devido a interações específicas entre o ânion fosfato e a bicamada, já que valência, polarizabilidade, tamanho e hidratação do contra-íon afetam a sua interação com a bicamada de DODAB (Marra, 1986; Ahuja *et al.*, 1994; Nascimento *et al.*, 1998).

Em presença de dAMP, a transição de fase de fragmentos de bicamada ocorre entre 30°C e 47°C, o pico em 36°C sofre uma diminuição e o pico endotérmico mais intenso está deslocado de 43,7°C para 45,3°C (Figura 18A e B). Esse pequeno aumento de T_m é esperado devido à blindagem eletrostática das cabeças positivas de DODAB pelos fosfatos de dAMP (Figura 8E), que diminui a repulsão entre as cabeças e aumenta ligeiramente o empacotamento da bicamada. Apesar de ser um pouco mais ampla, a transição fragmentos de bicamada na presença de dAMP apresenta um perfil muito parecido com o de fragmentos em água, fato que é reforçado pelo ΔH semelhante (Tabela 4). Assim, dAMP não é capaz de aumentar o empacotamento da bicamada de fragmentos de DODAB como Na_2HPO_4 na mesma faixa de concentrações testadas. Isso está de acordo com os dados de turbidimetria, determinação de diâmetros médios e fluorescência de PyPC, que mostram que dAMP não provoca fusão dos fragmentos (Figuras 7B, 8B e 15D).

Na presença de 0,04mM poli(dA), a transição de fase de fragmentos de bicamada de DODAB ocorre entre 30°C e 55°C e o pico endotérmico mais intenso permanece em 43,7°C, mas aparecem outros dois picos por volta de 48°C e 52°C (Figura 18C). O valor de ΔH aumenta cerca de 20% quando comparado com o de fragmentos de bicamada em

Figura 18- Termogramas de 2 mM fragmentos de bicamada de DODAB em presença de 2 mM dAMP (A); 4 mM dAMP (B); 0,04 mM poli(dA) (C) ou 1 mM poli(dA) (D).

água pura (Tabela 4). Isso sugere um aumento de empacotamento da bicamada que é consistente com a presença de fragmentos fundidos observada no ensaio de PyPC para essa proporção de 1:50 poli(dA):DODAB (Figuras 15E e F). Nessa proporção molar também já é possível observar aumento de turbidez (Figura 7C) e de diâmetro médio (Figura 8C).

Em presença de 1mM poli(dA) a transição de fase ocorre entre 30°C e 55°C, o pico endotérmico mais intenso é estreito e encontra-se deslocado para 53,4°C (Figura 18D). Esse aumento de T_m sugere um maior empacotamento da bicamada já que a transição só consegue ser completada em temperatura tão elevada.

Oligodeoxinucleotídeos simples-fita com menos de 20 nucleotídeos de tamanho são bastões rígidos e carregados em solução (Walker e Grant, 1998). Assim, o oligodeoxinucleotídeo poli(dA), que tem 10 nucleotídeos de tamanho, pode se adsorver à

superfície positiva dos fragmentos de bicamada de DODAB sem deixar pedaços da molécula expostos ao meio, i.e., sem a formação dos chamados “trains” e “loops”. As fortes ligações entre os fosfatos do poli(dA) e as cabeças carregadas de DODAB poderiam ser responsáveis pelo maior empacotamento da bicamada. O valor de ΔH nesse caso é semelhante àquele de vesículas grandes em água (Tabela 4), e sugere que, da mesma forma que Na_2HPO_4 , poli(dA) é capaz de induzir a fusão de fragmentos. De fato, na proporção molar de 1:2 poli(dA):DODAB o sistema coloidal com fragmentos e oligodeoxinucleotídeo encontra-se na região de supercompensação de cargas (Figuras 8C e F), em que a fusão atinge intensidade máxima (Figuras 15E e F).

Na Figura 18 também são mostrados os termogramas de dAMP e poli(dA) em água, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios com fragmentos de bicamada. O aquecimento de soluções aquosas de oligodeoxinucleotídeos simples-fita faz com que eles percam a estrutura helicoidal devida ao empilhamento de bases e passem a apresentar uma estrutura desordenada (McDonald *et al.*, 1964; Johnson Jr., 1996). Em nenhum dos controles é percebida variação da capacidade calorífica, o que mostra que o calorímetro utilizado não é sensível o suficiente para registrar a desnaturação de poli(dA) nas concentrações testadas. Assim, esses controles mostram que as transições observadas se devem exclusivamente às bicamadas de DODAB.

A fim de verificar se há diferenças na interação entre oligodeoxinucleotídeos e fragmentos ou vesículas grandes foram obtidos os termogramas de 0,7mM vesículas grandes de DODAB em água e em presença de poli(dA) (Figura 19). Para as vesículas em água, é possível observar um único pico de absorção de calor em 44,7°C correspondente à transição de fase gel para líquido-cristalina (Figura 19). Na presença de 0,27mM de poli(dA), por outro lado, são observados dois picos menos intensos em 52,8°C e 54,8°C (Figura 19).

Figura 19- Termogramas de 0,7 mM vesículas grandes de DODAB em água pura ou em presença de 0,27 mM poli(dA).

Nessa proporção molar de 1:2,6 poli(dA):DODAB, o sistema coloidal contendo vesículas grandes e oligodeoxinucleotídeo encontra-se na região de supercompensação de cargas (Figuras 9A e B), em que a fusão é máxima (Figura 16A e B). Na Figura 18D também há supercompensação de cargas e fusão máxima, mas o perfil de transição de fase para DODAB BF em presença de poli(dA) é diferente, apresentando apenas um pico intenso em 53,4°C. Da mesma forma, termogramas de bicamadas de DODAB sonicadas e extrusadas interagindo com excesso de DNA dupla-fita apresentam apenas um pico endotérmico intenso em 52°C (Barreleiro *et al.*, 2000), o que mostra que vesículas grandes e fragmentos de bicamada interagem de forma diferente com oligodeoxinucleotídeos em condições de excesso de cargas negativas.

Os dois picos de absorção de calor observados na Figura 19 podem indicar a presença de diferentes populações de moléculas de DODAB numa mesma bicamada, que sofrem transições distintas. A adsorção superficial de poli(dA) poderia provocar modificações locais da curvatura das vesículas que resultariam, por exemplo, na compressão de segmentos da

monocamada externa e na expansão de segmentos da monocamada interna. Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão mostram que oligodeoxinucleotídeos interagindo com vesículas catiônicas mistas de DOTAP/colesterol induzem a mudança de segmentos curvos de bicamada para planos, sobretudo em locais onde as vesículas estão agregadas (Weisman *et al.*, 2004).

Sabe-se que alterações na curvatura afetam a pressão lateral entre as moléculas de uma bicamada e modificam o perfil de transição de bicamadas de fosfolipídios (Brumm *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999). Esse efeito não seria percebido nos fragmentos de bicamada porque nesse caso as duas monocamadas estariam disponíveis para adsorver poli(dA), e essa simetria poderia anular o efeito de alteração local da curvatura da bicamada.

4.3- Efeito da natureza do ânion estabilidade e comportamento de fase de DODAB BF

O ânion fosfato pode ganhar ou perder prótons, o que faz com que sua valência e a proporção de espécies com diferentes valências mude com o pH. A Figura 20 mostra as diferentes valências do ânion fosfato de Na_2HPO_4 e dAMP e os seus respectivos pK_a s.

Figura 20- Esquema de ionização dos ânions fosfato de Na_2HPO_4 (A) e dAMP (B). Os valores de pK_a para os grupos fosfato de Na_2HPO_4 e dAMP foram obtidos em Kotz e Treichel, 1999 e em Mucha *et al.*, 2008, respectivamente.

A fim de verificar se há diferenças de cargas entre Na_2HPO_4 e dAMP nos ensaios realizados, o pH de soluções aquosas do sal e do nucleotídeo foi medido (Figura 21A). O pH da água pura encontra-se por volta de 6,0 devido à dissolução de CO_2 e formação de ácido carbônico. Para as mesmas concentrações de fosfato adicionadas, Na_2HPO_4 causou um aumento de pH enquanto que dAMP causou um decréscimo (Figura 21A). O aumento de pH causado por Na_2HPO_4 pode ser explicado pelo fato de que ele é um sal dibásico (Kotz e Treichel, 1999). Por outro lado, o decréscimo de pH causado por dAMP pode ser explicado pelo fato de seu grupo fosfato agir com um ácido fraco (Mucha *et al.*, 2008). Além disso, a adenosina é uma base fraca com um pK_a de 3,97 (Mucha *et al.*, 2008).

Figura 21 - pH (A) e concentração de carga negativa (B) em soluções aquosas de dAMP (O) e de Na_2HPO_4 (□) em função da concentração de eletrólito adicionado.

Para a faixa de pHs medidos, o equilíbrio mais importante do ponto de vista de proporção entre espécies com diferentes valências é o que ocorre entre ânions mono e divalente, tanto para Na_2HPO_4 quanto para dAMP. Assim, é possível calcular a concentração de cargas negativas disponível para cada concentração de Na_2HPO_4 ou de dAMP testada (Figura 21B). Pode-se notar que a partir de 0,25mM de fosfato adicionado, Na_2HPO_4 é capaz de gerar maior concentração de carga negativa do que dAMP, e que a partir de 0,5mM de fosfato adicionado Na_2HPO_4 gera o dobro da concentração de cargas negativas do que dAMP (Figura 21B). Isso ocorre porque dAMP apresenta uma maior proporção de fosfatos monovalentes em toda a faixa de concentrações testadas, enquanto que Na_2HPO_4 apresenta uma maior proporção de fosfatos divalentes a partir de 0,25mM Na_2HPO_4 , conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5- pH e concentração de cargas negativas para soluções aquosas de Na_2HPO_4 e de dAMP.

$[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ (mM)	[dAMP] (mM)	pH	$[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ (mM)	$[\text{HPO}_4^{2-}]$ (mM)	[carga negativa]* (mM)
0,05	—	6,43	0,043	0,007	0,057
0,1	—	6,80	0,072	0,028	0,128
0,25	—	7,63	0,069	0,181	0,431
0,5	—	7,90	0,085	0,416	0,917
1,0	—	8,07	0,121	0,876	1,873
2,5	—	8,01	0,342	2,158	4,658
—	0,05	4,43	0,049	0,0006	0,0502
—	0,1	4,29	0,099	0,001	0,101
—	0,25	3,89	0,249	0,001	0,251
—	0,5	3,78	0,498	0,001	0,500
—	1,0	3,65	0,998	0,001	1,000
—	2,5	3,60	2,495	0,005	2,505

*[carga negativa] = $1x[\text{H}_2\text{PO}_4^-] + 2x[\text{HPO}_4^{2-}]$ (mM)

Assim, para o intervalo de concentrações testado, dAMP comporta-se como ânion monovalente e Na_2HPO_4 comporta-se predominantemente como ânion divalente. Isso poderia explicar as diferenças de interação com os fragmentos de bicamada de DODAB observadas nas seções anteriores, como a capacidade de Na_2HPO_4 de induzir a fusão de fragmentos, que não é observada para dAMP.

Para investigar se há diferenças nas interações entre DODAB BF e íons de valência fixa e variável, foram realizados ensaios de turbidimetria, espalhamento de luz dinâmico e DSC com NaCl, um sal monovalente cuja carga independe do pH, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para Na_2HPO_4 e dAMP.

A Figura 22 mostra as cinéticas de turbidez em 300nm para 0,5mM DODAB BF em presença de diferentes concentrações de NaCl.

Figura 22- Cinéticas de turbidez em 300 nm para 0,5 mM DODAB BF em presença de NaCl. As concentrações de NaCl são 0,5 (■); 1 (○); 5 (▲); 10 (▽); 20 (◆); 40 (◁); 50 (▴) e 100mM (□). O branco é 0,5 mM DODAB BF.

Aumento de turbidez só é observado para concentrações de NaCl maiores do que 20mM (Figura 22). O aumento de turbidez é perceptível a partir das proporções molares de 1:1 Na₂HPO₄:DODAB e de 40:1 NaCl:DODAB (Figuras 7A e 22), mostrando que Na₂HPO₄ é mais eficiente do que NaCl para agregar e/ ou fundir DODAB BF. Essa diferença também se reflete na intensidade das cinéticas, já que 2,5mM Na₂HPO₄ faz a turbidez aumentar para 0,6 em 20 minutos de ensaio, enquanto que 100mM NaCl faz a turbidez aumentar para apenas 0,2 no mesmo tempo. Por outro lado, dAMP e NaCl não são capazes de induzir aumento de turbidez nas baixas concentrações testadas: até 2,5mM no caso de dAMP e até 10mM no caso de NaCl (Figuras 7B e 22). Isso mostra que ânions divalentes são muito mais eficientes do que os monovalentes para induzir agregação e / ou fusão de DODAB BF.

A Figura 23 mostra os diâmetros médios e potenciais-zeta de DODAB BF em presença de diferentes concentrações de NaCl. Da mesma forma que nos ensaios de turbidimetria, aumento de diâmetro médio é observado a partir de 20mM NaCl (Figura 23A). Novamente observa-se maior eficiência de Na₂HPO₄, que já é capaz de aumentar Dz numa proporção de 1:1 Na₂HPO₄:DODAB (Figura 8A).

O aumento de diâmetro na presença de 100mM NaCl é maior do que o observado com 2,5mM Na₂HPO₄ (Figuras 8A e 23A), o que contrasta com a turbidez observada nas cinéticas de turbidez com as mesmas concentrações de NaCl e Na₂HPO₄ (Figuras 7A e 22). Essa aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que a polidispersidade em presença de 2,5mM Na₂HPO₄ é maior do que em presença de 100mM NaCl, o que indica que há um número maior de partículas espalhando luz no primeiro caso (Tabela 6).

Para concentrações de NaCl menores do que 5mM, o diâmetro médio cai cerca de 20nm (Figura 23B). Uma queda da mesma ordem de grandeza também é observada para concentrações de dAMP menores do que 2,5mM e para concentrações de Na₂HPO₄ menores do que 0,25mM (Figuras 8A e B e Tabela 6). Como discutido anteriormente, em baixa força

iônica a repulsão eletrostática entre fragmentos diminui e eles passam a se movimentar mais rapidamente em solução, o que é interpretado como D_z menor.

Figura 23- Efeito da concentração de NaCl sobre o diâmetro médio (A e B) e o potencial-zeta (C) de 0,5 mM fragmentos de bicamada de DODAB. Em (B) estão detalhados os diâmetros médios para a faixa de concentração de 0 – 5 mM NaCl.

Tabela 6 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB em presença de NaCl, Na₂HPO₄, dAMP ou poli(dA). δ é o erro padrão das medidas.

[DODAB]	[NaCl]	[Na ₂ HPO ₄]	[dAMP]	[poli(dA)]	Dz $\pm \delta$	$\zeta \pm \delta$	P $\pm \delta$
(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(nm)	(mV)	
0,5	—	—	—	—	88,7 $\pm$ 0,8	49,80 $\pm$ 0,90	0,243 $\pm$ 0,004
0,5	0,5	—	—	—	68,0 $\pm$ 0,5	47,69 $\pm$ 1,58	0,256 $\pm$ 0,005
0,5	5	—	—	—	68,4 $\pm$ 0,5	43,49 $\pm$ 3,72	0,285 $\pm$ 0,002
0,5	100	—	—	—	494,1 $\pm$ 15,3	—	0,308 $\pm$ 0,008
0,5	—	0,5	—	—	129,4 $\pm$ 0,5	20,75 $\pm$ 1,44	0,302 $\pm$ 0,005
0,5	—	2,5	—	—	406,1 $\pm$ 8,2	15,64 $\pm$ 2,50	0,369 $\pm$ 0,011
0,5	—	—	0,5	—	71,6 $\pm$ 0,5	33,60 $\pm$ 0,90	0,260 $\pm$ 0,005
0,5	—	—	2,5	—	67,2 $\pm$ 0,4	27,37 $\pm$ 2,94	0,268 $\pm$ 0,006
0,5	—	—	—	0,05	534,3 $\pm$ 33,6	17,37 $\pm$ 19,34	0,361 $\pm$ 0,008
0,5	—	—	—	0,25	178,0 $\pm$ 3,2	-47,16 $\pm$ 1,61	0,296 $\pm$ 0,006

Fragmentos de bicamada preparados com DODAC, um lipídio análogo de DODAB cujo contra-íon é cloreto, apresentam um aumento de turbidez a partir da proporção molar de 23:1 NaCl:DODAC (Carmona e Chaimovich, 1986), i.e, numa proporção molar que é cerca de metade daquela observada para NaCl e DODAB (Figura 22). Fusão de fragmentos também foi observada na proporção de 114:1 NaCl:DODAC em ensaios com PyPC (Carmona *et al.*, 1985). Espectros de massa mostraram que os lipídios usados nesses ensaios apresentavam uma mistura de cadeias de alquil de 75% C18: 25% C16 (Cuccovia *et al.*, 1979). Assim, essas bicamadas teriam maior número de defeitos hidrofóbicos e seriam mais suscetíveis à fusão, o que explicaria o aumento de turbidez numa proporção menor. De fato, essas bicamadas

apresentam transições de fase mais amplas ao redor de T_m menores do que aquelas observadas para bicamadas formadas por DODAC puro, em que as duas cadeias de alquil apresentam 18 carbonos (Carmona e Chaimovich, 1986; Nascimento *et al.*, 1998). Desse modo, não é possível comparar aqueles resultados com os obtidos utilizando fragmentos de bicamadas preparados com DODAB puro como os do presente trabalho.

A Figura 24 mostra o efeito de NaCl sobre as distribuições de tamanho dos DODAB BF. Observa-se que em concentrações pequenas de NaCl, como 0,5mM e 5mM, as distribuições estão deslocadas para diâmetros menores (Figura 24B e C), como observado para dAMP (Figura 11). Já na concentração de 100mM NaCl, as distribuições estão deslocadas para diâmetros maiores (Figura 24D), indicando agregação e/ ou fusão de fragmentos, como no caso de Na_2HPO_4 (Figura 10).

O potencial-zeta sofre redução muito pequena com a adição de NaCl (Figura 23C). Isso é esperado levando-se em conta que o ânion cloreto tem menor afinidade pela bicamada de DODAB do que o ânion brometo (Scarpa *et al.*, 2002). Esse conjunto de dados sugere que a maior eficiência de Na_2HPO_4 para induzir aumento de turbidez e Dz está relacionada à sua maior eficiência em reduzir o potencial-zeta dos fragmentos de bicamada. Assim, a blindagem mais eficiente de cargas, com conseqüente diminuição da repulsão eletrostática entre os fragmentos, levaria ao predomínio de forças atrativas de Van der Waals e, conseqüentemente, à agregação e fusão de fragmentos. Essa maior eficiência para reduzir o potencial-zeta, por sua vez, está relacionada ao fato de Na_2HPO_4 ser divalente. A teoria de Gouy-Chapman prevê que íons divalentes afetem mais o potencial elétrico do que íons monovalentes, já que a espessura da dupla camada elétrica varia inversamente com a raiz quadrada da força iônica (Shaw, 1970; McLaughlin, 1989).

De fato, 2,5mM dAMP produz mais cargas negativas do que 0,5mM ou 1mM Na_2HPO_4 , mas não é capaz de reduzir tanto o potencial-zeta (Figuras 8D e E). Além disso,

Figura 24- Distribuições de tamanho para 0,5mM DODAB BF em água (A) ou em presença de 0,5mM (B), 5mM (C) ou 100mM NaCl. Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

já é possível observar aumento de turbidez, diâmetro e fusão com essas concentrações menores de Na_2HPO_4 e não com dAMP (Figuras 7B, 8B e 15D). Da mesma forma, 5mM NaCl produz mais cargas do que 0,5mM ou 1mM Na_2HPO_4 , mas não é capaz de reduzir

substancialmente o potencial-zeta nem de aumentar turbidez e Dz (Figuras 22 e 23C). Isso permite concluir que a fusão é dirigida por interações eletrostáticas e que a natureza do ânion pode ser mais importante do que sua quantidade na interação com bicamadas de DODAB.

A Figura 25 mostra o efeito de NaCl sobre termogramas de 2mM DODAB BF. Em presença de 2mM NaCl, a transição de fase de fragmentos começa por volta de 25°C e termina por volta de 46°C, o pico em 36°C sofre uma diminuição e o pico endotérmico mais intenso está deslocado de 43,7°C para 44,7°C (Figura 25A). A entalpia de transição $\Delta H = 6,3 \pm 0,1$ kcal/mol é semelhante às observadas para DODAB BF em água pura ou em presença de 2mM ou 4mM dAMP (Tabela 4). Isso mostra que nessa proporção molar de 1:1 NaCl:DODAB não está ocorrendo fusão de fragmentos, e está de acordo com o observado nos ensaios de turbidimetria e de DLS (Figuras 22 e 23).

A transição de fase em presença de 100mM NaCl é larga, apresentando picos entre 35°C e 40°C e um pico endotérmico mais intenso e definido em 47,3°C (Figura 25B). A entalpia de transição $\Delta H = 11,7 \pm 1,4$ kcal/mol é semelhante à de vesículas grandes em água ou a de fragmentos em presença de Na_2HPO_4 (Tabela 4). Isso sugere a formação de grande superfície de bicamada empacotada, é coerente com o aumento de turbidez e Dz na proporção de 50:1 NaCl:DODAB (Figuras 22 e 23), e indica a fusão de fragmentos como observado para Na_2HPO_4 (Figuras 7A, 8A, 15B e 17). Os picos entre 35°C e 40°C, porém, sugerem que ainda há uma população de DODAB BF que não sofreu fusão, cuja transição ocorre no mesmo intervalo de temperaturas observado para BF em água (Figura 25B). A T_m de 47,3°C, maior do que a observada para DODAB BF em água, é esperada devido à blindagem eletrostática das cabeças positivas de DODAB pelo ânion cloreto, que diminui a repulsão entre elas e aumenta ligeiramente o empacotamento da bicamada, e já foi observada para vesículas grandes de DODAB em presença de NaCl (Benatti *et al.*, 2007).

Figura 25- Termogramas de 2mM DODAB BF em presença de 2 mM (A) ou 100 mM NaCl (B).

2mM dAMP induz uma diminuição de potencial-zeta e um aumento de T_m maior do que 2mM NaCl (Figuras 8E, 23C, Tabelas 4 e 6). Isso sugere uma maior afinidade de dAMP pelos DODAB BF, o que não é esperado considerando que ambos são monovalentes.

Uma explicação para essa maior afinidade pode estar no fato de que dAMP é um ânion hidrofóbico. Modelagem molecular mostra que dAMP é capaz de mudar sua conformação de *anti* para *syn* em presença de DODAB BF e de inserir sua base nitrogenada na bicamada (Kikuchi *et al.*, 1999; Nantes *et al.*, 2003). Espectros de dicroísmo circular (CD) mostram um pico negativo em 197nm mais intenso em meio de menor polaridade, como trifluoretol, do

que em água (Nantes *et al.*, 2003). Um pico semelhante é observado em presença de micelas de CTAB, que são estruturas muito curvas, e em presença de DODAB BF, sugerindo que dAMP interage com porções hidrofóbicas de bicamadas de DODAB (Nantes *et al.*, 2003). Os ensaios de DSC com dAMP mostram um ligeiro aumento de T_m , com maior empacotamento das cabeças carregadas por blindagem eletrostática, mas sem alteração de ΔH (Tabela 4). Isso sugere que as bases nitrogenadas interagem com porções menos empacotadas próximas às bordas dos fragmentos. Experimentos com ESR mostram que dAMP não altera o empacotamento das cabeças ou caudas de vesículas do lipídio catiônico diC14-amidina na fase líquido-cristalina, mas aumenta o empacotamento da fase gel devido à blindagem eletrostática (Benatti *et al.*, 2009). De forma semelhante, dAMP seria capaz de aumentar o empacotamento da fase gel de DODAB BF, mas a interação hidrofóbica com porções mais fluidas da bicamada não seria detectada por DSC.

Além disso, os espectros de CD mostram um aumento do empilhamento de bases nitrogenadas em presença de DODAB BF (Nantes *et al.*, 2003), o que sugere um ordenamento de dAMP sobre a superfície dos fragmentos. A exposição de grupos volumosos como a desoxirribose e a base nitrogenada na superfície dos DODAB BF poderia ser um obstáculo à fusão. Assim, apesar de a fusão de fragmentos de bicamada de DODAB ser dirigida por interações eletrostáticas, a repulsão estérica provocada por dAMP também poderia contribuir para manter a estabilidade coloidal dos fragmentos.

4.4- Efeito de fragmentos de bicamada de DODAB sobre espectros de dicroísmo circular de poli(dA)

O efeito dos fragmentos de bicamada de DODAB sobre a estrutura de poli(dA) foi investigado através de espectroscopia de CD (Figura 26). Para escolher as concentrações de fragmentos a serem utilizados nos ensaios, cinéticas de turbidez de 0,05mM poli(dA) em

300nm foram obtidas (Figura 26A). Observa-se que concentrações de fragmentos maiores que 0,5mM induzem um aumento muito grande de turbidez, que poderia comprometer os ensaios de CD devido ao intenso espalhamento de luz. Assim, foram obtidos espectros de CD de 0,05mM poli(dA) em água e na presença das seguintes concentrações de fragmentos: 0,1; 0,2; e 0,3mM (Figura 26B).

O espectro de CD de poli(dA) em água apresenta um pico negativo em 207nm e picos positivos entre 210nm e 240nm que são característicos de empilhamento de bases nitrogenadas (Johnson Jr., 1996). Esse empilhamento de bases faz com que o oligodeoxinucleotídeo apresente uma estrutura de hélice em “mão direita” em solução aquosa (Johnson Jr., 1996). O pico positivo em 260nm não aparece em espectros de dAMP (Nantes *et al.*, 2003) e pode ser atribuído às ligações fosfodiéster que conferem ao poli(dA) seu caráter polimérico.

Na presença de 0,1mM fragmentos o espectro é muito similar ao do oligodeoxinucleotídeo em água (Figura 26B), sugerindo que a bicamada catiônica não afeta o empilhamento de bases e a estrutura helicoidal de poli(dA). Nessa condição experimental há 5 vezes mais cargas negativas do que positivas e isso pode explicar porque o espectro não sofreu modificação. Assim, na região de supercompensação de cargas, em que há excesso de carga negativa, o oligodeoxinucleotídeo mantém sua estrutura helicoidal.

É possível observar que na presença de 0,2 e 0,3mM fragmentos ocorrem grandes alterações dos espectros de CD (Figura 26B), como a diminuição e achatamento dos picos entre 210nm e 240nm, o alargamento do pico positivo em 260nm e o aparecimento de picos positivos em 200nm. Essas alterações sugerem a perda do empilhamento de bases e, conseqüentemente, da estrutura helicoidal na presença de concentrações crescentes de poli(dA). Entretanto, não se pode afirmar isso de forma inequívoca, uma vez que pode estar ocorrendo o fenômeno de espalhamento diferencial de luz.

Figura 26- Efeito de fragmentos de bicamada de DODAB sobre espectros de turbidez em 300nm (A) e de dicroísmo circular (B) de 0,05mM poli(dA). Em (A), as concentrações de fragmento são 0,1 (■); 0,2 (○); 0,3 (△); 0,5 (▽); 1 (◆); 2,5 (◁); 4 (▶) e 5mM (□). Em (B), espectros de 0,05mM poli(dA) foram obtidos em água (—) ou em 0,1 (■); 0,2 (○) e 0,3mM (△) fragmentos de bicamada de DODAB.

O espalhamento diferencial de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita resulta em picos de CD anormalmente grandes ou pequenos e sinais fora dos picos de absorção usuais (Mao e Wallace, 1984). É um fenômeno comum para partículas iguais ou maiores do que $1/20$ do comprimento de onda da luz incidente (Bustamante *et al.*, 1983), como é o caso dos fragmentos de DODAB, que possuem diâmetros de aproximadamente

90nm (Tabela 6); e já foi descrito para espectros de CD de plasmídeos (que são moléculas de DNA dupla-fita circulares) na presença de vesículas de lipídios catiônicos (Braun *et al.*, 2003). Nesse caso, o efeito de espalhamento diferencial passou a ocorrer próximo da neutralidade de cargas (Braun *et al.*, 2003); esse é o caso das concentrações de 0,2 e 0,3 mM de fragmentos utilizadas nesse ensaio: lembrando-se que cada moléculas de poli(dA) tem 10 cargas negativas, as razões de carga (-/+) são de 2,5:1 e 1,6:1, respectivamente.

Uma forma de contornar o problema é mudar a posição do detector (Braun *et al.*, 2003), o que não é possível no aparelho Jasco utilizado nesses ensaios. Outra forma é utilizar uma fonte de luz síncrotron (SRCD), que além de permitir o ajuste da posição do detector, permite o uso de amostras muito diluídas (pouco turvas) porque fornece uma luz polarizada muito intensa (Wallace, 2009). Infelizmente, não há ainda fonte de SRCD no Brasil.

Os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Ciani e colaboradores (2007), que investigaram a interação de oligodeoxinucleotídeos com vesículas catiônicas mistas de DOTAP e dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE): numa razão de cargas negativas/positivas de 5, o espectro não sofre alterações. Conforme a razão diminui e se inverte, ocorrem modificações na região entre 210nm e 260nm, com achatamento dos picos. Nesse caso, as mudanças foram atribuídas à mudança conformacional resultante da condensação das moléculas de oligodeoxinucleotídeo por blindagem das cargas, mesmo sendo descrito um aumento de opalescência do sistema (Ciani *et al.*, 2007).

Diante disso, é necessária cautela para atribuir as mudanças observadas nos espectros à mudança conformacional na estrutura de poli(dA). Assim, os ensaios que têm menor chance de apresentar artefatos são aqueles com menor turbidez, como é o caso de 0,05mM poli(dA) em presença de 0,1mM fragmentos de bicamada de DODAB, cuja turbidez se mantém estável e próxima de 0,1 durante todo o tempo do experimento.

4.5- Estabilidade coloidal de DODAB BF/ OVA/ CpG

Ovalbumina (OVA) é a proteína mais abundante da clara do ovo (Nisbet *et al.*, 1981). É uma glicoproteína fosforilada que possui 385 resíduos de aminoácidos, uma peso molecular total de 44,3 kDa (Tai *et al.*, 1977; Nisbet *et al.*, 1981) e um ponto isoeletrico (pI) de 4,5 (Beeley *et al.*, 1972). No pH por volta de 6,0 da água pura ela está negativamente carregada, o que permite uma interação eletrostática com os DODAB BF positivamente carregados e a formação de complexos DODAB BF/OVA.

A Figura 27 mostra a estabilidade coloidal de soluções de OVA em presença de diferentes concentrações de DODAB BF através da determinação de Dz ao longo do tempo. A concentração de 0,1mg/mL OVA foi escolhida porque permite a injeção de 20µg OVA por animal. Protocolos de imunização subcutânea utilizam massas que variam de 5µg a 100µg OVA/animal (Macedo *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2007). É possível observar que Dz aumenta de forma rápida e intensa com a adição de até 0,05mM DODAB BF (Figura 27A). A adição de concentrações de DODAB BF maiores do que 0,05mM leva a uma progressiva diminuição de Dz, que permanecem constantes ao longo do tempo indicando a formação de complexos estáveis por até 24 horas (Figura 27B).

O aumento de Dz com a adição de até 0,05mM DODAB BF é acompanhado pelo aumento de ζ (Figura 27C), que parte de um valor negativo correspondente ao excesso de cargas negativas de OVA até chegar em um valor ligeiramente positivo na presença de 0,05mM DODAB BF. O fato de Dz ser máximo e de a curva de ζ sofrer inflexão na presença de 0,05mM DODAB BF indica que essa é a concentração necessária para neutralizar as cargas de 0,1mg/mL OVA. Concentrações de DODAB BF maiores do que 0,05mM induzem a formação de complexos menores e mais estáveis graças à repulsão eletrostática propiciada

Figura 27- Efeito da concentração de DODAB BF sobre a estabilidade coloidal de soluções de 0,1mg/mL OVA. Diâmetros médios em função do tempo na presença de 0,005 (■); 0,01 (○); 0,02 (▲); 0,05 (▽); 0,1 (◆); 0,2 (□); 0,5 (●) e 1mM DODAB BF (△) são mostrados em (A) e detalhados para as concentrações maiores de DODAB BF em (B). Potenciais-zeta dos complexos DODAB BF / OVA após 1 hora de interação são mostrados em (C). Complexos preparados em 1mM NaCl.

por potenciais-zeta positivos em excesso de DODAB BF (Figuras 27A, B e C). Essa estabilização coloidal está mostrada nas distribuições de tamanho da Figura 28.

Figura 28- Distribuições de tamanho para 0,1 mg/mL OVA em presença de 0,005 (A), 0,05 (B), 0,1 (C) e 1mM DODAB BF (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

DODAB é citotóxico, sendo que 1mM DODAB BF é capaz de matar 50% de fibroblastos normais de camundongos BALB/c após 30 minutos de interação (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997). Isso exige minimização de dose para aplicação *in vivo* e, portanto, escolheu-se trabalhar com complexos formados por 0,1mM DODAB BF e 0,1mg/mL OVA. Essa condição, em que a concentração de DODAB BF é dez vezes menor do que a dose letal média, já foi utilizada com sucesso para a imunização de camundongos (Lincopan *et al.*, 2009) e apresenta complexos DODAB BF/OVA estáveis, pequenos (Dz com cerca de 250nm) e positivamente carregados (Figuras 27A, B e C). A presença de carga positiva é fundamental para a adsorção do oligodeoxinucleotídeo CpG, que é um poliânion.

Nos complexos formados por 0,1mg/mL OVA e 0,1mM DODAB BF há $2,2 \times 10^{-6}$ M OVA e 100×10^{-6} M DODAB, ou seja, uma proporção molar de 1:45 OVA:DODAB. Aproximando DODAB BF de discos com 30nm de raio médio (r) e com as duas faces voltadas para o meio, a área disponível por disco é de $2 \pi r^2 = 2 \times 3,14 \times 900 = 5652 \text{nm}^2$. Como cada molécula de DODAB ocupa aproximadamente $0,6 \text{nm}^2$ (Carmona-Ribeiro e Midmore, 1992; Nascimento *et al.*, 1998), então há cerca de 9420 moléculas de DODAB por fragmento de bicamada. Se as moléculas de proteína se distribuem uniformemente pelos DODAB BF, i.e., seguindo a proporção molar de 1:45 OVA:DODAB, então há $9420/45 = 209$ moléculas de OVA por DODAB BF. Esse é o carregamento (“loading”) teórico de OVA por DODAB BF.

A estabilidade coloidal de complexos DODAB BF/OVA foi avaliada na presença de diferentes concentrações de CpG (Figura 29). É possível observar que a adição de concentrações crescentes de CpG provoca um aumento de Dz em função do tempo, atingindo um máximo na presença de $5 \mu\text{M}$ CpG (Figura 29A). Para concentrações de oligodeoxinucleotídeo maiores, ocorre uma progressiva diminuição de Dz e um aumento da

estabilidade coloidal, uma vez que Dz deixa de variar significativamente em função do tempo (Figura 29B).

Figura 29- Efeito de CpG sobre a estabilidade coloidal de complexos DODAB BF/ OVA preparados em 1mM NaCl. Os diâmetros médios dos complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA são mostrados em função do tempo em presença de 1 (■), 2 (○), 5 (▲), 10 (▽), 20 (◆), 50 (<) e 100 μ M CpG (>) em (A) e detalhados para as concentrações maiores de CpG em (B).

Da mesma forma, a Figura 30A mostra um aumento de Dz até um máximo em presença de $5\mu\text{M}$ CpG. Esse aumento é acompanhado de uma diminuição de ζ (Figura 30B), sugerindo que $5\mu\text{M}$ CpG é capaz de neutralizar complexos formados por $0,1\text{mM}$ DODAB BF e $0,1\text{mg/mL}$ OVA. Para concentrações de CpG maiores do que $5\mu\text{M}$, Dz diminuem e ζ tornam-se negativos (Figuras 30A e B). Esse comportamento típico de polieletrólito interagindo com partícula de carga oposta, em que neutralização de cargas leva à agregação e/ou fusão e supercompensação de cargas leva à reestabilização coloidal do sistema por repulsão eletrostática, já foi observado para a interação de oligodeoxinucleotídeos com DODAB BF (Figura 8C e F).

A Figura 31 mostra as distribuições de tamanho de complexos DODAB BF/OVA na presença de CpG. A adição de OVA aos DODAB BF desloca as distribuições de tamanho para diâmetros maiores. Isso também ocorre quando se adiciona CpG em uma condição em que os complexos DODAB BF/OVA/CpG ainda possuem cargas positivas (Figura 31C). Para a condição de supercompensação de cargas, as distribuições de tamanho apresentam diâmetros intermediários entre DODAB BF e complexos DODAB BF/OVA (Figuras 31A, B e D).

De fato, na Tabela 7, que detalha as propriedades físico-químicas dos complexos, é possível observar que os complexos contendo as maiores concentrações de CpG, $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$, possuem ζ negativos e Dz menores do que a própria preparação DODAB BF/OVA. É possível que nesse caso o oligodeoxinucleotídeo CpG esteja presente em concentração suficiente para desalojar por competição as moléculas de OVA da superfície dos fragmentos.

Com o propósito de comparação, também foram caracterizados complexos entre DODAB BF, CpG e a proteína BSA. Essa caracterização está mostrada na próxima seção.

Figura 30- Efeito da concentração de CpG sobre os diâmetros médios (A) e os potenciais-zeta (B) de complexos DODAB BF / OVA após 1 hora de interação. Os complexos foram preparados em 1mM NaCl e as concentrações finais de DODAB BF e de OVA são 0,1mM e 0,1mg/mL, respectivamente.

Figura 31- Distribuições de tamanho para 0,1mM DODAB BF (A), para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA (B) e para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL OVA na presença de 1 μ M (C) ou 20 μ M CpG (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

Tabela 7 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB e para complexos entre fragmentos de bicamada de DODAB, OVA e CpG preparados em 1mM NaCl após 1hora de interação. δ é o erro padrão das medidas.

Dispersão	[DODAB] (mM)	[OVA] (mg/mL)	[CpG] (mM)	Dz $\pm \delta$ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)	P $\pm \delta$
DODAB BF	0,1	-	-	66,6 $\pm$ 0,3	46,61 $\pm$ 0,53	0,251 $\pm$ 0.006
DODAB BF/OVA	0,1	0,1	-	274,0 $\pm$ 1,9	20,76 $\pm$ 0,37	0,291 $\pm$ 0.008
DODAB BF/OVA/ CpG 1 μ M	0,1	0,1	0,001	353,4 $\pm$ 9,8	14,33 $\pm$ 1,81	0,351 $\pm$ 0.012
DODAB BF/OVA/ CpG 2 μ M	0,1	0,1	0,002	1314,5 $\pm$ 35,5	11,26 $\pm$ 1,44	0,425 $\pm$ 0.010
DODAB BF/OVA/ CpG 5 μ M	0,1	0,1	0,005	4297,4 $\pm$ 203,0	5,12 $\pm$ 1,11	0,390 $\pm$ 0.017
DODAB BF/OVA/ CpG 10 μ M	0,1	0,1	0,01	1459,0 $\pm$ 65,7	-7,73 $\pm$ 1,43	0,417 $\pm$ 0.013
DODAB BF/OVA/ CpG 20 μ M	0,1	0,1	0,02	245,3 $\pm$ 1,2	-26,01 $\pm$ 0,57	0,151 $\pm$ 0.017
DODAB BF/OVA/ CpG 50 μ M	0,1	0,1	0,05	232,0 $\pm$ 1,8	-31,15 $\pm$ 0,79	0,165 $\pm$ 0.015
DODAB BF/OVA/ CpG 100 μ M	0,1	0,1	0,1	206,3 $\pm$ 1,0	-33,53 $\pm$ 1,36	0,195 $\pm$ 0.017

4.6- Estabilidade coloidal de DODAB BF/ BSA/ CpG

Albumina de soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais extensamente estudadas e aplicadas em bioquímica (Carter e Ho, 1994). Possui 583 resíduos de aminoácidos, um peso molecular de 66,4 kDa (Hirayama *et al.*, 1990) e um pI por volta de 4,8 (Beeley *et al.*, 1972; Malamud e Drysdale, 1978). Assim como OVA, BSA também possui carga negativa em água pura, podendo se adsorver eletrostaticamente sobre bicamadas de DODAB (Carvalho e Carmona-Ribeiro, 1998). De fato, complexos entre DODAB BF e BSA tiveram recentemente a estabilidade coloidal e a atividade imunológica caracterizadas (Lincopan *et al.*, 2009).

A Figura 32 mostra a estabilidade coloidal de complexos formados por 0,1mM DODAB BF e 0,1mg/mL BSA em presença de várias concentrações de CpG. Essas concentrações de fragmentos e proteína foram escolhidas para permitir uma comparação com os complexos formados com OVA. Os complexos DODAB BF/BSA são estáveis, já que Dz não varia com o tempo (Figura 32A).

A adição de CpG até 5 μ M provoca o aumento do valor de Dz, mas os complexos são estáveis por até 24 horas, já que Dz não varia com o tempo (Figura 32A). Por outro lado, a adição de 10 μ M CpG provoca um aumento intenso de Dz ao longo do tempo, provocando precipitação visível dos agregados, como pode ser observado para as medidas de 3 e 24 horas (Figura 32B). Isso sugere que essa concentração de CpG é capaz de neutralizar a carga dos complexos.

A adição de CpG em concentrações maiores do que 10 μ M provoca a diminuição de Dz e reestabilização do sistema coloidal (Figura 32B), provavelmente por supercompensação de cargas. A Figura 33 mostra Dz e ζ dos complexos em função da concentração de CpG após 1 hora de interação. Adição de concentrações crescentes de CpG produz aumento de Dz até

Figura 32- Efeito de tempo e de concentração de oligodeoxinucleotídeo CpG sobre o diâmetro de complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em 1mM NaCl. Diâmetros de 0,1mM DODAB BF (■); 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA (○) e 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em presença de 1 (▲), 2 (▽) e 5 μM CpG (◆) são mostrados em (A). Diâmetros de 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA em presença 10 (□), 20 (●), 50 (△) e 100 μM CpG (▼) são mostrados em (B).

um máximo em 10 μM CpG (Figura 33A); esse aumento é acompanhado de redução de ζ até a neutralização (Figura 33B). Para concentrações de CpG maiores do que 10 μM, Dz diminui até valores semelhantes aos iniciais e ζ diminui até valores muito negativos (Figura 33A e B).

Esse comportamento típico de polieletrólito interagindo com partícula de carga oposta já foi observado para complexos DODAB BF/OVA/CpG (Figura 30), entretanto, no caso de DODAB BF/OVA a neutralização foi atingida utilizando 5 μ M CpG, que é metade daquela necessária para neutralizar DODAB BF/BSA.

Figura 33- Efeito da concentração de CpG sobre os diâmetros médios (A) e os potenciais-zeta (B) de complexos DODAB BF / BSA após 1 hora de interação. Os complexos foram preparados em 1mM NaCl e as concentrações finais de DODAB BF e de BSA são 0,1mM e 0,1mg/mL, respectivamente.

As propriedades físicas dos complexos DODAB BF/BSA/CpG são detalhadas na Tabela 8 e as distribuições de tamanho para complexos antes e depois da neutralização de cargas são mostradas na Figura 34.

Tabela 8 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para fragmentos de bicamada de DODAB e para complexos entre fragmentos de bicamada de DODAB, BSA e CpG preparados em 1mM NaCl após 1hora de interação. δ é o erro padrão das medidas.

Dispersão	[DODAB] (mM)	[BSA] (mg/mL)	[CpG] (mM)	Dz $\pm \delta$ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)	P $\pm \delta$
DODAB BF	0,1	-	-	66,6 $\pm$ 0,3	46,61 $\pm$ 0,53	0,251 $\pm$ 0,006
DODAB BF/BSA	0,1	0,1	-	64,3 $\pm$ 0,5	38,67 $\pm$ 0,98	0,245 $\pm$ 0,005
DODAB BF/BSA/ CpG 1 μ M	0,1	0,1	0,001	127,7 $\pm$ 0,5	37,66 $\pm$ 2,19	0,223 $\pm$ 0,008
DODAB BF/BSA/ CpG 2 μ M	0,1	0,1	0,002	131,8 $\pm$ 0,4	33,25 $\pm$ 0,48	0,245 $\pm$ 0,009
DODAB BF/BSA/ CpG 5 μ M	0,1	0,1	0,005	174,4 $\pm$ 0,8	25,27 $\pm$ 2,39	0,177 $\pm$ 0,009
DODAB BF/BSA/ CpG 10 μ M	0,1	0,1	0,01	2362,7 $\pm$ 79,5	0,39 $\pm$ 4,48	0,445 $\pm$ 0,017
DODAB BF/BSA/ CpG 20 μ M	0,1	0,1	0,02	224,7 $\pm$ 1,2	-18,53 $\pm$ 0,52	0,161 $\pm$ 0,011
DODAB BF/BSA/ CpG 50 μ M	0,1	0,1	0,05	145,9 $\pm$ 1,4	-33,41 $\pm$ 2,00	0,301 $\pm$ 0,008
DODAB BF/BSA/ CpG 100 μ M	0,1	0,1	0,1	134,6 $\pm$ 0,8	-37,35 $\pm$ 2,72	0,215 $\pm$ 0,009

Figura 34- Distribuições de tamanho para 0,1mM DODAB BF (A), para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA (B) e para complexos 0,1mM DODAB BF / 0,1mg/mL BSA na presença de 1µM (C) ou 20µM CpG (D). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição. Complexos preparados em 1mM NaCl.

É interessante notar que o complexo entre DODAB BF e BSA apresenta tamanho semelhante àquele de DODAB BF em 1mM NaCl (Figuras 32A, 34A e B e Tabela 8). Isso já havia sido observado e atribuído à repulsão de hidratação associada a moléculas de água fortemente ligadas à superfície de moléculas de BSA adsorvidas sobre DODAB BF (Lincopan *et al.*, 2009), e contrasta com o tamanho maior observado nos complexos DODAB BF/OVA (Tabela 7).

Nos complexos formados por 0,1mg/mL BSA e 0,1mM DODAB BF há $1,5 \times 10^{-6}$ M BSA e 100×10^{-6} M DODAB, ou seja, uma proporção molar de 1:66 BSA:DODAB. Assim, da mesma maneira que para OVA, é possível estimar que existam $9420/66 = 143$ moléculas de BSA por DODAB BF. Observando os pesos moleculares e os pIs é possível concluir que BSA é uma proteína maior e menos carregada negativamente do que OVA, o que implicaria num menor número de moléculas de BSA adsorvidas sobre DODAB BF e seria coerente com o carregamento 32% menor do que o calculado para OVA.

O maior carregamento resultante da maior adsorção superficial de OVA poderia explicar porque para as mesmas concentrações de proteínas e DODAB BF o complexo DODAB BF/OVA apresenta Dz aproximadamente 4 vezes maior e ζ aproximadamente 0,5 vezes menor do que os observados para complexo DODAB BF/BSA (Tabelas 7 e 8). Também poderia explicar porque é necessário menos CpG para neutralizar os complexos DODAB BF/OVA do que os complexos DODAB BF/BSA. Isso mostra que as propriedades físico-químicas dos complexos são dependentes do tipo de proteína utilizada, e ressalta a importância da caracterização físico-química de cada complexo proteína-fragmento antes da aplicação *in vivo*.

Para realizar a caracterização imunológica *in vivo*, optou-se por usar complexos com a proteína OVA, que apresenta carregamento maior e que é freqüentemente usada como antígeno modelo na busca de novos adjuvantes (Stewart-Tull, 1991; Brgles *et al.*, 2008).

Além disso, BSA não foi capaz de provocar resposta celular satisfatória em presença de adjuvantes como fragmentos e nanopartículas de DODAB (Lincopan *et al.* 2009; Lincopan *et al.*, 2009 b).

Assim, foram testados *in vivo* os complexos 0,1mM DODAB BF/ 0,1mg/mL OVA com 1 μ M ou 20 μ M CpG. A concentração de 1 μ M foi escolhida por ser a maior concentração de CpG em que complexos estáveis ao longo do tempo apresentam carga positiva e Dz menor do que 500nm. De forma análoga, 20 μ M foi escolhida por ser a menor concentração de CpG em que complexos estáveis apresentam carga negativa e Dz menor do que 500nm.

Células dendríticas são capazes de capturar antígenos através de diferentes mecanismos, como endocitose mediada por receptor, fagocitose e macropinocitose (Banchereau e Steinman, 1998). Entretanto, foram escolhidos para os ensaios *in vivo* complexos com Dz menores do que 500nm porque partículas com esses tamanhos são eficientemente capturadas por essas células (Foged *et al.*, 2005). A escolha de complexos com cargas diferentes permite comparar o efeito das cargas na indução de resposta imune, já que normalmente uma maior eficiência de captura de partículas por células do sistema imune é atribuída à presença de cargas positivas (Thiele *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2006).

4.7- Estabilidade coloidal de Al(OH)₃/ OVA/ CpG

Sais de alumínio são utilizados como adjuvantes há mais de 70 anos e ainda são considerados padrões para comparação com novas formulações (Storni *et al.*, 2005; Mbow *et al.*, 2010). Assim, optou-se por utilizar Al(OH)₃ como controle para comparar com as preparações utilizando DODAB. Portanto, procedeu-se uma caracterização físico-química de 0,1mg/mL Al(OH)₃ na presença de OVA e CpG nas mesmas concentrações utilizadas nas preparações com DODAB, uma vez que essa concentração de Al(OH)₃ já foi utilizada anteriormente (Lincopan *et al.*, 2009 b).

A Tabela 9 detalha as propriedades físico-químicas de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e de seus complexos com OVA e CpG.

Tabela 9 – Diâmetros médios (Dz), potenciais-zeta (ζ) e polidispersidades (P) para $\text{Al}(\text{OH})_3$ e para complexos $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/\text{CpG}$ em 1mM NaCl. δ é o erro padrão das medidas.

Dispersão	[$\text{Al}(\text{OH})_3$] (mg/mL)	[OVA] (mg/mL)	[CpG] (mM)	Dz $\pm \delta$ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)	P $\pm \delta$
$\text{Al}(\text{OH})_3$	0,1	-	-	3147,2 $\pm$ 196,6	15,70 $\pm$ 1,54	0,415 $\pm$ 0,018
$\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}$	0,1	0,1	-	916,1 $\pm$ 17,3	-28,69 $\pm$ 1,40	0,231 $\pm$ 0,020
$\text{Al}(\text{OH})_3/\text{CpG}$ 1 μM	0,1	-	0,001	3650,4 $\pm$ 93,5	14,71 $\pm$ 0,46	0,412 $\pm$ 0,024
$\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/$ CpG 1 μM	0,1	0,1	0,001	524,0 $\pm$ 6,4	-31,39 $\pm$ 0,44	0,162 $\pm$ 0,027
$\text{Al}(\text{OH})_3/\text{CpG}$ 20 μM	0,1	-	0,02	3584,5 $\pm$ 74,2	9,44 $\pm$ 1,13	0,407 $\pm$ 0,026
$\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/$ CpG 20 μM	0,1	0,1	0,02	570,1 $\pm$ 19,2	-34,63 $\pm$ 2,09	0,210 $\pm$ 0,020

$\text{Al}(\text{OH})_3$ é um particulado grande, catiônico e muito polidisperso (Tabela 9) que precipita rapidamente. Aliás, uma das explicações para sua ação adjuvante é a capacidade de formar um depósito de antígeno no local de aplicação, que permite uma captação prolongada do antígeno pelas células do sistema imune (Aguilar e Rodríguez, 2007; Mbow *et al.*, 2010; Peek *et al.*, 2008).

A adição de 0,1mg/mL OVA a 0,1mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ resulta numa diminuição de Dz e polidispersidade e na inversão de ζ , que se torna negativo (Tabela 9). Isso sugere um aumento de estabilidade coloidal. Mesmo assim, seu tamanho ainda é mais de 3 vezes maior do que os

observados para complexos DODAB BF/OVA (Tabela 7). Com a adição de CpG aos complexos $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}$, Dz e polidispersidade diminuem ainda mais e ζ torna-se ainda mais negativo (Tabela 9). Essa aparente estabilização coloidal pode ocorrer devido a um aumento de repulsão eletrostática devido à adsorção de OVA e CpG sobre as partículas de alumínio. Esse efeito é claramente observado na Figura 35: a interação de OVA e $\text{Al}(\text{OH})_3$ diminui os picos correspondentes aos diâmetros maiores do que 1000nm e aumenta os picos por volta de 500nm-700nm (Figuras 35A, D, E e F). Por outro lado, a adição apenas de CpG pouco afeta a distribuição de tamanho (Figuras 35A, B e C), Dz e ζ (Tabela 9), provavelmente porque as concentrações de CpG testadas não permitem um recobrimento eficiente das partículas de alumínio.

É interessante observar que apesar de menores do que 0,1mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$, os complexos $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/\text{CpG}$ ainda apresentam Dz maior do que 500nm (Tabela 9), sendo maiores do que os complexos análogos de DODAB BF/OVA/CpG para as concentrações de 1 μM e 20 μM CpG (Tabela 7). Entretanto, é importante destacar que a polidispersidade para complexos $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{OVA}/\text{CpG}$ 1 μM é menor do que para DODAB BF/OVA/CpG 1 μM , fato que se reflete nas distribuições de tamanho: enquanto no primeiro caso as maiores distribuições de tamanho oscilam ao redor de 682nm (Figura 35E), no segundo elas oscilam ao redor de 823nm (Figura 31C). Isso pode ter implicações na atividade imunológica, pois partículas menores são mais eficientemente capturadas por células dendríticas (Foged *et al.*, 2005).

Figura 35- Distribuições de tamanhos de 0,1 mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ (A), de complexos entre 0,1 mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ e 1 μM (B) ou 20 μM CpG (C), de complexos entre 0,1 mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ e 0,1 mg/mL OVA (D) e de complexos entre 0,1 mg/mL $\text{Al}(\text{OH})_3$ e 0,1 mg/mL OVA na presença de 1 μM (E) ou 20 μM CpG (F). Os números dentro dos gráficos correspondem aos picos mais intensos de cada distribuição.

4.8- Atividade imunoadjuvante de DODAB BF/ OVA/ CpG e Al(OH)₃/ OVA/ CpG

A resposta imune adaptativa resultante da imunização de camundongos BALB/c com OVA em diferentes formulações de adjuvantes foi caracterizada através do ensaio de hipersensibilidade tardia (DTH), da dosagem de anticorpos anti-OVA e da dosagem de citocinas coletadas em sobrenadantes de culturas de células de linfonodos. Como controles, foram testados sistemas contendo apenas os adjuvantes DODAB, CpG ou Al(OH)₃ e combinações de DODAB+CpG e Al(OH)₃+CpG sem o antígeno OVA. Na ausência de OVA não houve diferença em relação aos camundongos não-imunizados (naive), mostrando que a resposta imune adaptativa é antígeno-específica, e por isso esses resultados não aparecem nas figuras. Para facilitar a compreensão, os resultados serão todos descritos e em seguida relacionados e discutidos.

A resposta imune celular foi caracterizada através de ensaio de DTH (Figura 36), em que ativação de macrófagos e inflamação mediadas por células T em resposta ao desafio com antígeno causam inchaço local (Abbas *et al.*, 2000).

Os camundongos imunizados com OVA; OVA+CpG 1μM; OVA+Al(OH)₃ e OVA+Al(OH)₃+CpG 1μM apresentaram inchaço de cerca de 0,25mm, semelhante ao observado para camundongos naive. Por outro lado, grupos imunizados com OVA+CpG 20μM e OVA+Al(OH)₃+CpG 20μM apresentam inchaço cerca de duas vezes mais intenso do que o grupo controle naive. As preparações contendo DODAB BF (OVA+DODAB; OVA+DODAB+CpG 1μM; OVA+DODAB+CpG 20μM) apresentaram respostas celulares muito intensas, com inchaços no mínimo quatro vezes mais intensos do que os observados para camundongos naive ou imunizados com OVA+Al(OH)₃ (Figura 36).

Figura 36- Reação de hipersensibilidade tardia em camundongos imunizados subcutaneamente com OVA em diferentes preparações de adjuvantes é expressa como aumento de espessura de pata (nm) $\pm$ erro padrão da média. Camundongos foram desafiados 5 dias após a imunização com 60µg OVA agregada e testados para hipersensibilidade 24 horas depois. Camundongos não-imunizados (naive) foram desafiados da mesma forma para testar inchamento inespecífico. Concentrações finais são 0,1mg/mL para OVA e Al(OH)₃ e 0,1mM para DODAB BF. *p<0.05 comparado com naive; # p<0.05 comparado com OVA + Al(OH)₃; Δ p<0.05 comparado com OVA + DODAB + CpG 20µM.

OVA+DODAB e OVA+DODAB+CpG 1 μ M induzem inchaços semelhantes, da ordem de 1,1mm, entretanto a preparação OVA+DODAB+CpG 20 μ M induz um inchaço de pata cerca de 25% maior do que o observado para OVA+DODAB (Figura 36).

A resposta imune humoral foi caracterizada através da dosagem de anticorpos (imunoglobulinas) anti-OVA presentes no soro ao longo do tempo (Figura 37). Foram dosados os isotipos IgG1 e IgG2a, que são característicos de respostas Th2 e Th1, respectivamente (Stevens *et al.*, 1988; Liew, 2002). Aliás, a mudança de isotipo com produção de IgG2a é utilizada para caracterizar a formação de resposta Th1 (Klinman *et al.*, 1999; Weeratna *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004; Klinman *et al.*, 2009). O fato de terem sido usadas diluições diferentes de soro para dosar os isotipos e de as dosagens serem expressas como densidade óptica faz com que seja possível comparar os efeitos apenas entre os mesmos isotipos. Uma análise quantitativa que permite comparação entre os isotipos IgG1 e IgG2a só é possível quando os valores são expressos como títulos de anticorpos, em que efeitos de diluição e de variação de densidades ópticas são corrigidos (Klinman *et al.*, 1999; Weeratna *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004).

Observa-se na Figura 37 que a produção de anticorpos cai ao longo do tempo, o que é esperado uma vez que não foi dado reforço com preparações contendo antígeno. Os camundongos imunizados com OVA ou com OVA+adjuvantes produzem mais IgG1 e IgG2a do que os camundongos naive. Os camundongos imunizados com OVA+DODAB produzem IgG1 em quantidade semelhante aos imunizados com OVA+Al(OH)₃ no 14º dia após imunização, mas produzem bem menos a partir do 21º dia (Figuras 37A e B). Além disso, produzem mais IgG2a do que os imunizados com OVA+Al(OH)₃ do 14º ao 35º dia após imunização (Figuras 37C e D).

Figura 37- Produção de anticorpos anti-OVA com isotipos IgG1 (A,B) e IgG2a (C,D) em função do tempo para camundongos imunizados com OVA em diferentes formulações dos adjuvantes DODAB, CpG ou Al(OH)₃. Concentrações finais são 1 μM (A,C) ou 20 μM CpG (B,D); 0,1mg/mL OVA; 0,1mg/mL Al(OH)₃ e 0,1mM DODAB BF. A quantificação de anticorpos do soro foi feita através de ELISA e expressa como a densidade óptica (OD) média ± desvio padrão de 5 animais/grupo. A quantificação em camundongos naive serve para detectar anticorpos não específicos para OVA. * p<0.05 comparado com naive; # p<0.05 comparado com OVA + Al(OH)₃; Δ p<0.05 comparado com OVA + DODAB + CpG.

Os grupos imunizados com OVA+DODAB+CpG 1 μM e OVA+DODAB+CpG 20 μM produzem do 14° ao 35° dia menos IgG1 do que o grupo imunizado com OVA+Al(OH)₃ (Figuras 37A e B). Esses grupos que contêm DODAB+CpG também produzem menos IgG1 do que o imunizado com OVA+DODAB até o 21° dia; e produzem mais IgG1 do que o grupo OVA+DODAB no 28° e no 35° dias (Figuras 37A e B). A partir do 21° dia, os grupos

OVA+DODAB+CpG 1 μ M e OVA+DODAB+CpG 20 μ M produzem mais IgG2a do que o grupo imunizado com OVA+DODAB.

O grupo imunizado com OVA+Al(OH)₃+CpG 1 μ M produz mais IgG1 do que o grupo OVA+Al(OH)₃ no 14° dia e menos a partir do 21° dia (Figura 37A), mas produz a mesma quantidade de IgG2a do que OVA+Al(OH)₃ todos os dias (Figuras 37C). Já o grupo OVA+Al(OH)₃+CpG 20 μ M produz mais IgG1 do que o imunizado com OVA+Al(OH)₃ até o 21° dia e produz menos IgG1 a partir do 28° dia. Além disso, OVA+Al(OH)₃+CpG 20 μ M produz mais IgG2a do que OVA+Al(OH)₃ todos os dias (Figuras 37B e D).

O grupo OVA+Al(OH)₃+CpG 20 μ M produz a mesma quantidade de IgG2a do que o grupo OVA+DODAB+CpG 20 μ M a partir do 28° dia, mas o grupo OVA+DODAB+CpG 20 μ M produz mais IgG2a desde o 14° dia (Figura 37D) e produz sempre menos IgG1 do que os grupos OVA+Al(OH)₃ ou OVA+Al(OH)₃+CpG 20 μ M (Figura 37B).

Os grupos imunizados com OVA+CpG 1 μ M e OVA+CpG 20 μ M produzem mais IgG1 do que o grupo imunizado apenas com OVA todos os dias após imunização (Figuras 37A e B). O grupo OVA+CpG 1 μ M produz mais IgG2a do que o grupo OVA do 14° ao 28° dia, e uma quantidade igual no 35° dia após imunização (Figura 37C). Já o grupo OVA+CpG 20 μ M produz mais IgG2a do que o grupo OVA apenas no 14° dia, produzindo uma quantidade igual do 21° ao 35° dia após imunização (Figura 37D).

O grupo OVA+CpG 1 μ M produz menos IgG1 do que os grupos OVA+Al(OH)₃ e OVA+DODAB todos os dias após imunização (Figura 37A), produz uma quantidade igual de IgG2a do que OVA+Al(OH)₃ e uma quantidade menor de IgG2a do que OVA+DODAB todos os dias (Figura 37C). O grupo OVA+CpG 20 μ M também produz menos IgG1 do que os grupos OVA+Al(OH)₃ e OVA+DODAB todos os dias (Figura 37B). O grupo OVA+CpG 20 μ M produz uma quantidade igual de IgG2a do que OVA+Al(OH)₃ no 14°, 28° e 35° dias

após imunização, e uma quantidade menor no 21º dia (Figura 37D). Também produz menos IgG2a do que o grupo OVA+DODAB todos os dias após imunização (Figura 37D).

A Figura 38 mostra as concentrações das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-13 presentes no sobrenadante de culturas de células de linfonodos de camundongos imunizados com OVA em diferentes preparações de adjuvantes. A dosagem dessas citocinas serve para caracterizar se o meio em que estão os linfócitos Th possui estímulos que induzem o desenvolvimento de uma resposta Th1 (caso predominem IFN- γ e IL-12) ou Th2 (caso predominem IL-10 e IL-13). A produção de citocinas é maior para células estimuladas com a lectina concanvalina A (ConA), que é um ativador policlonal de células T (Abbas *et al.*, 2000), do que com o antígeno OVA. Assim, serão descritos e discutidos os resultados referentes a células estimuladas especificamente com o antígeno OVA.

As células de camundongos imunizados com OVA; OVA+Al(OH)₃ e OVA+Al(OH)₃+CpG 1 μ M produzem IFN- γ e IL-12 em quantidades pequenas, que são iguais ou pouco maiores do que o limite de detecção da técnica (Figuras 38A e B), de forma semelhante ao observado para células incubadas apenas com meio de cultura, i.e., na ausência de estímulo.

O grupo OVA+CpG 1 μ M secreta 0,331ng/ml IFN- γ e 0,47ng/ml IL-12, que são quantidades cerca de 5 e 4 vezes maiores de IFN- γ e de IL-12 do que as secretadas pelo grupo imunizado apenas com OVA (Figuras 38A e B). Da mesma forma, o grupo OVA+CpG 20 μ M secreta cerca de 29 vezes mais IFN- γ e 6 vezes mais IL-12 do que o grupo OVA (Figura 38A e B). A secreção de 1,78ng/ml IFN- γ e de 0,75ng/ml IL-12 pelo grupo OVA+CpG 20 μ M é cerca de 12% menor e 13% maior do que as respectivas citocinas secretadas pelo grupo OVA+DODAB (Figura 38A e B).

Figura 38- Citocinas secretadas por células de linfonodos de camundongos imunizados com OVA em diferentes formulações. Células de linfonodos de camundongos BALB/c imunizados com 20μg OVA em 1mM NaCl ou em presença dos adjuvantes DODAB, CpG ou Al(OH)₃ foram estimuladas *in vitro* com meio, 250μg/mL OVA ou 2,5μg/mL ConA por 48 horas. Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) foram determinados através de ELISA “sanduíche”. Os resultados são expressos como a média das concentrações de citocinas (ng/ml) para dois ensaios diferentes ± desvio padrão da média. A linha tracejada vermelha representa o limite de detecção. Concentrações finais de adjuvantes são 0,1mg/mL Al(OH)₃, 0,1mM DODAB BF e 1μM ou 20μM CpG. * p<0.05 comparado com OVA + Al(OH)₃; # p<0.05 comparado com OVA + DODAB + CpG 1μM; Δ p<0.05 comparado com OVA + DODAB + CpG 20μM.

OVA+Al(OH)₃+CpG 20μM induz a secreção de 0,675ng/ml IFN-γ, que é cerca de 10 vezes mais IFN-γ do que é secretado pelo grupo OVA+Al(OH)₃. Da mesma forma, OVA+Al(OH)₃+CpG 20μM induz a secreção de 0,46ng/ml IL-12, que é quase o dobro da quantidade dessa citocina secretada pelo grupo OVA+Al(OH)₃ (Figura 38A e B).

A maior produção de IFN- γ ocorre em grupos imunizados com preparações contendo DODAB (Figura 38A). A produção de IFN- γ e de IL-12 é semelhante nos grupos imunizados com OVA+DODAB e OVA+DODAB+CpG 1 μ M. Entretanto, OVA+DODAB+CpG 20 μ M induz a produção de 36% mais IFN- γ e de 60% mais IL-12 do que OVA+DODAB+CpG 1 μ M. OVA+DODAB+CpG 20 μ M induz a produção de 33% mais IFN- γ e de 49% mais IL-12 do que OVA+DODAB. Também induz a produção de 52% mais IFN- γ e de 35% mais IL-12 do que OVA+CpG 20 μ M (Figura 38A e B).

As Figuras 38 C e D mostram que a maior secreção de IL-10 e de IL-13 ocorre em camundongos imunizados com Al(OH)₃. OVA+Al(OH)₃+CpG 1 μ M induz a secreção de IL-10 e de IL-13 em quantidades semelhantes às observadas para o grupo OVA+Al(OH)₃. Já OVA+Al(OH)₃+CpG 20 μ M induz a secreção de cerca de 50% menos IL-10 e de cerca de 45% menos IL-13 do que OVA+Al(OH)₃ (Figuras 38C e D).

Os grupos OVA+CpG 1 μ M e OVA+CpG 20 μ M induzem a secreção de 66% e de 75% menos IL-10 do que o grupo OVA+Al(OH)₃ (Figura 38C). Da mesma forma, induzem a secreção de 3 e de 4,5 vezes menos IL-13 do que o grupo OVA+Al(OH)₃ (Figura 38D). OVA+CpG 1 μ M secreta cerca de 50% mais IL-10 e uma quantidade semelhante de IL-13 do que o grupo OVA+DODAB. Já OVA+CpG 20 μ M produz uma quantidade semelhante de IL-10 e cerca de 50% menos IL-13 do que OVA+DODAB (Figuras 38C e D).

As menores secreções de IL-10 e de IL-13 ocorrem para os grupos imunizados com preparações contendo DODAB (Figuras 38C e D). OVA+DODAB e OVA+DODAB+CpG 1 μ M secretam 77% menos IL-10 do que OVA+Al(OH)₃; de forma semelhante OVA+DODAB+CpG 20 μ M secreta 80% menos IL-10 do que OVA+Al(OH)₃ (Figura 38C). OVA+DODAB; OVA+DODAB+CpG 1 μ M e OVA+DODAB+CpG 20 μ M secretam 3, 6 e 7 vezes menos IL-13 do que OVA+Al(OH)₃, respectivamente (Figura 38D).

O grupo inoculado com OVA apresentou um inchaço pequeno no ensaio de DTH (Figura 36) e uma pequena produção de citocinas (Figura 38). Assim, apesar da maior produção de IgG1 e de IgG2a quando comparado ao grupo naíve (Figura 37), fica clara a necessidade de usar adjuvantes para melhorar a resposta imune contra esse antígeno modelo, sobretudo a resposta imune celular.

O grupo OVA+DODAB apresentou um grande inchaço de pata (Figura 36), uma grande produção de IgG2a (Figuras 37C e D) e grande secreção de IFN- γ e de IL-12 (Figuras 38A e B). Isso mostra que DODAB é um adjuvante capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1, conforme descrito anteriormente para fragmentos de bicamada e nanopartículas de DODAB (Lincopan *et al.*, 2009; Lincopan *et al.*, 2009b) e para lipossomos mistos de DODAB e monofosforil-lipídio-A (Korsholm *et al.*, 2009). Por outro lado, OVA+Al(OH)₃ não induziu inchaço de pata (Figura 36) nem a secreção de grande quantidade de IFN- γ e de IL-12 (Figuras 38A e B), mas induziu grande secreção de IL-10 e de IL-13 (Figuras 38C e D). Isso confirma que Al(OH)₃ é um adjuvante eficiente para induzir resposta Th2 (Lindblad, 2004; Korsholm *et al.*, 2009).

O oligodeoxinucleotídeo CpG não induz hipersensibilidade tardia na concentração de 1 μ M, mas induz na concentração de 20 μ M (Figura 36). Da mesma forma, o grupo OVA+CpG 20 μ M secreta mais IFN- γ e IL-12 do que OVA+CpG 1 μ M (Figuras 38A e B). Isso sugere que o efeito adjuvante de CpG depende da dose administrada. O oligodeoxinucleotídeo CpG utilizado nos experimentos possui um esqueleto com ligações fosfodiéster e apresenta a seguinte sequência de bases nitrogenadas: 5'- TTG**ACGTT**CG-3'. Assim, ele possui duas repetições CpG (em negrito) e a sequência GACGTT, que é muito eficiente para ativar o sistema imune de camundongos (Krieg, 2003). A separação das repetições CpG por sequências TT também melhora a eficiência de reconhecimento das sequências pelo sistema imune (Krieg, 2006). Sabendo-se que o peso molecular do CpG é 3034g/mol e que foram

injetados 0,2mL por animal, então 1 μ M e 20 μ M CpG correspondem à aplicação de 0,6 μ g e 12 μ g CpG por animal, respectivamente. Normalmente, os ensaios *in vivo* utilizam 10 μ g CpG por animal (Kuramoto *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007; Florindo *et al.*, 2009), que corresponde aproximadamente à massa de oligodeoxinucleotídeo recebida pelos camundongos imunizados com preparações contendo 20 μ M CpG. Assim, a diferença de eficiência na ação adjuvante de CpG 20 μ M e de CpG 1 μ M pode ser explicada pela pequena disponibilidade de oligodeoxinucleotídeo para ser capturado pelas APCs nesse último caso.

Esse efeito de dose é reforçado quando se observa que OVA+Al(OH)₃+CpG1 μ M não afeta a hipersensibilidade tardia, a produção de IgG2a e a secreção de citocinas quando comparado com OVA+Al(OH)₃. Já OVA+Al(OH)₃+CpG20 μ M apresenta maior inchaço de pata, maior produção de IgG2a e maior secreção de IFN- γ e de IL-12 do que OVA+Al(OH)₃ (Figuras 36, 37 e 38). A capacidade de CpG de modular a ação adjuvante de Al(OH)₃ e direcioná-la para uma resposta Th1 já havia sido observada (Weeratna *et al.*, 2000), entretanto essa é a primeira descrição do efeito de dose sobre a ação adjuvante de CpG, seja usando oligodeoxinucleotídeo sozinho ou em combinação com outro adjuvante.

A imunização com OVA+DODAB e com OVA+CpG20 μ M induz a secreção de quantidades semelhantes das quatro citocinas dosadas (Figura 38), mostrando que, assim como DODAB, CpG também é capaz de induzir uma resposta Th1, como esperado (Krieg, 2006). O fato de OVA+DODAB induzir maior inchaço de pata e maior produção de IgG2a do que OVA+CpG20 μ M (Figuras 36 e 37D) pode se dever ao fato de que foi utilizada uma concentração cinco vezes maior de DODAB do que de CpG. É importante destacar que a polarização para resposta Th1, representada pela grande secreção de IFN- γ e de IL-12, foi induzida por um oligodeoxinucleotídeo CpG com esqueleto de fosfodiéster, i.e., nativo. Normalmente, são utilizados oligodeoxinucleotídeos com o esqueleto modificado com ligações fosforotioato, que contêm enxofre, a fim de protegê-los da ação de nucleases (Krieg,

2006). O uso desse tipo de modificação é tão disseminado que chegou a ser criada uma classificação de oligodeoxinucleotídeos CpG que, além da sequência de bases, leva em consideração a presença dessas modificações (Krieg, 2002; Vollmer e Krieg, 2009)

O uso de CpG modificado com fosforotioato apresenta algumas desvantagens quando comparado ao CpG nativo: a quiralidade do fósforo nos esqueletos modificados afeta o reconhecimento do oligodeoxinucleotídeo pelo TLR9, com o estereoisômero R sendo preferido (Krieg *et al.*, 2003b); a menor secreção de citocinas como IFN- α por células dendríticas estimuladas com CpG modificado (Krieg, 2006); a indução de toxicidade sistêmica como ativação da cascata do complemento e mudanças na permeabilidade vascular (Galbraith *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2002). Isso mostra que o uso de oligodeoxinucleotídeos CpG com esqueleto nativo de fosfodiéster, como no presente trabalho, pode ser mais vantajoso.

O grupo OVA+DODAB+CpG20 μ M apresenta maior inchaço de pata, maior produção de IgG2a ao longo do tempo, maior secreção de IFN- γ e de IL-12 e menor secreção de IL-10 e de IL-13 do que os grupos OVA+DODAB e OVA+CpG20 μ M (Figuras 36, 37D e 38). Assim, é possível concluir não só que a combinação de DODAB+CpG20 μ M é mais eficiente para induzir resposta Th1 do que DODAB ou CpG20 μ M separadamente, mas também que OVA+DODAB+CpG20 μ M é o grupo experimental que induz as respostas imunes celular e humoral mais fortes. É interessante observar que isso ocorre apesar de esse complexo possuir carga negativa (Figura 30 e Tabela 7). Normalmente atribui-se à presença de cargas positivas uma maior eficiência de captura de lipossomos e de partículas por APCs (Nakanishi *et al.*, 1997; Wischke *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2006; Zaks *et al.*, 2006), apesar de existirem partículas poliméricas aniônicas com ação adjuvante (Kazzaz *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006).

A atração eletrostática seria a responsável pela afinidade das partículas catiônicas pelas células, que possuem carga superficial negativa (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997). Por outro lado, foi demonstrado que partículas de poliestireno menores do que 500nm e negativamente carregadas são eficientemente capturadas por células dendríticas, e que a presença de cargas positivas seria importante apenas para a captura de partículas maiores do que 500nm (Foged *et al.*, 2005). Nesse caso, a maior eficiência de captura de partículas pequenas e negativas foi atribuída a uma menor interação não-específica com outros tipos celulares que não células dendríticas (Foged *et al.*, 2005). Esse pode ser também o caso para OVA+DODAB+CpG20μM.

A maior eficiência de ação adjuvante observada para OVA+DODAB+CpG20μM pode ser resultado da capacidade de DODAB BF de entregar conjuntamente CpG e OVA às APCs. De fato, já havia sido demonstrado que a entrega conjunta de CpG e antígenos por lipossomos catiônicos resulta em fortes respostas de células T (Zaks *et al.*, 2006). Adicionalmente, DODAB BF poderia proteger o oligodeoxinucleotídeo contra a degradação por nucleases sem a necessidade de modificação da estrutura química, conforme comentado anteriormente. A injeção intraperitoneal de oligodeoxinucleotídeos CpG formados por ligações fosfodiéster não tiveram impacto sobre a disseminação de tumores em camundongos, mas a injeção desses mesmos oligodeoxinucleotídeos protegidos por lipossomos catiônicos resultou em resposta imune capaz de diminuir a colonização por metástases e de aumentar o tempo de sobrevivência das cobaias (Kuramoto *et al.*, 2006). O presente trabalho é o primeiro a utilizar DODAB BF em conjunto com CpG para induzir resposta imune *in vivo*.

O efeito aditivo da combinação DODAB+CpG sugere que esses adjuvantes operam por mecanismos diferentes. A falta de efeitos aditivos ou sinérgicos para CpG combinado com outros adjuvantes como o adjuvante completo de Freund (*Complete Freund's Adjuvant*, CFA) e o monofosforil-lipídio-A foi atribuída à sobreposição de mecanismos de ação

(Weeratna *et al.*, 2000): no primeiro caso, CFA contém DNA bacteriano que poderia incluir motivos CpG que seriam reconhecidos por TLR9 da mesma forma que o oligodeoxinucleotídeo CpG; no segundo caso a ausência de efeito aditivo seria decorrente da capacidade de CpG e de monofosforil-lipídio-A de ativar macrófagos (Weeratna *et al.*, 2000).

O pequeno conhecimento acerca do mecanismo de ação adjuvante de DODAB impede um aprofundamento dessa discussão. Entretanto, a comparação da ação adjuvante de combinações DODAB+CpG com a ação adjuvante de DODAB e de CpG separadamente sobre diferentes grupos celulares e/ou mecanismos moleculares pode ser uma ferramenta útil para elucidar os mecanismos de ação adjuvante de DODAB. Assim, preparações contendo DODAB BF e CpG podem ser úteis inclusive em pesquisa básica.

OVA+DODAB+CpG20 μ M induz um inchaço de pata mais intenso, secreção maior de IFN- γ e de IL-12 e menor de IL-10 e de IL-13 do que o grupo OVA+Al(OH)₃+CpG20 μ M (Figuras 36 e 38). Também produz mais IgG2a no 14 $^{\circ}$ e no 21 $^{\circ}$ dia após imunização do que OVA+Al(OH)₃+CpG20 μ M, sugerindo o estabelecimento de uma resposta Th1 mais forte e precoce no grupo OVA+DODAB+CpG20 μ M (Figura 37D). Por tudo isso, CpG é mais vantajoso numa combinação com DODAB do que com Al(OH)₃, apesar de esse último ser o adjuvante mais largamente utilizado no mundo. Seria interessante ir além do uso de um antígeno modelo e testar o efeito da combinação DODAB BF / CpG com antígenos de patógenos intracelulares, como do protozoário causador da leishmaniose e do vírus da dengue, que são de interesse para a saúde pública no Brasil.

5- Conclusões

Neste trabalho são descritas pela primeira vez as interações entre oligodeoxinucleotídeos e fragmentos de bicamada do lipídio catiônico DODAB. Oligodeoxinucleotídeo induziu a fusão de fragmentos de bicamada de DODAB, com a formação de complexos cujos tamanhos aumentaram até um máximo no ponto de neutralização de cargas. Acima desse ponto, os complexos recuperaram a estabilidade coloidal por causa da supercompensação de cargas, e seus tamanhos permaneceram aproximadamente o dobro dos tamanhos iniciais. Na região de supercompensação de cargas, os espectros de dicroísmo circular sugerem que o oligodeoxinucleotídeo mantém sua estrutura helicoidal. Proporções de neutralização diferentes para fragmentos de bicamada e vesículas grandes de DODAB sugerem a presença de estruturas abertas e fechadas, respectivamente. Oligodeoxinucleotídeo aumenta o empacotamento da bicamada, e perfis diferentes dos termogramas sugerem estruturas diferentes para complexos entre oligodeoxinucleotídeos e fragmentos ou vesículas na região de supercompensação de cargas. Em concentrações equivalentes de cargas, nucleotídeo não afeta a estabilidade coloidal nem causa fusão de fragmentos, o que mostra a importância do caráter de polieletrólito do oligodeoxinucleotídeo para induzir fusão de fragmentos. O sal divalente Na_2HPO_4 causa fusão e aumenta o empacotamento da bicamada porque é capaz de blindar eficientemente as cargas dos fragmentos. Reestabilização coloidal como a induzida por oligodeoxinucleotídeo não ocorre em presença de Na_2HPO_4 , NaCl e nucleotídeo. Para concentrações iguais dos eletrólitos monovalentes, nucleotídeo causa maior redução do potencial-zeta e maior aumento da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina do que NaCl , sugerindo que o nucleotídeo tem maior afinidade pela bicamada de DODAB, provavelmente porque se comporta como um ânion hidrofóbico.

Também foram caracterizados os complexos entre fragmentos de bicamada, proteínas OVA e BSA e oligodeoxinucleotídeo CpG. A neutralização de cargas dos complexos fragmentos/proteínas por CpG desestabiliza o sistema coloidal, e a supercompensação de cargas leva à reestabilização por repulsão eletrostática, como observado para a interação de oligodeoxinucleotídeo com fragmentos de bicamada. Diferenças no tamanho dos complexos entre fragmentos e OVA ou BSA e nas proporções de neutralização por CpG reforçam a idéia de que os fragmentos são capazes de carregar mais moléculas de OVA do que de BSA. Para concentrações iguais, complexos formados por hidróxido de alumínio/ OVA/ CpG são maiores do que os formados por fragmentos de bicamada de DODAB/ OVA/ CpG.

O complexo DODAB 0,1mM/ OVA 0,1mg/ml / CpG 20 μ M, que possui carga negativa, induziu a resposta Th1 mais forte entre as preparações testadas. Isso mostra que CpG potencializa o efeito de DODAB. A eficiência também é maior do que a de preparações com o adjuvante tradicional hidróxido de alumínio. Arranjos negativamente carregados de oligodeoxinucleotídeos em fragmentos de bicamada de DODAB possuem grande potencial terapêutico.

6- Perspectivas

Este trabalho abre as seguintes perspectivas:

- caracterizar a morfologia dos complexos formados por oligodeoxinucleotídeos e vesículas grandes ou fragmentos de DODAB na região de supercompensação de cargas;
- investigar o efeito de bicamadas de DODAB sobre a estrutura de oligodeoxinucleotídeos através de espectroscopia de dicroísmo circular utilizando radiação síncrotron (SRCD), o que deve diminuir os efeitos de espalhamento de luz e permitir o uso de comprimentos de onda menores;
- testar o efeito de dose do antígeno apresentado pelos complexos adjuvantes formados por DODAB e CpG;
- testar os complexos adjuvantes formados por DODAB e CpG com antígenos de interesse médico;
- investigar o mecanismo de captura de complexos adjuvantes por células dendríticas utilizando, por exemplo, microscopia confocal;
- utilizar os complexos descritos na pesquisa do mecanismo adjuvante de DODAB;
- desenvolver novas formulações terapêuticas a base de drogas análogas a nucleotídeos ou oligonucleotídeos formuladas em bicamadas catiônicas.

7- Referências Bibliográficas

- Abbas** A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (2000) Cellular and Molecular Immunology, 4th Ed., W.B Saunders Co., New York, USA.
- Aguilar** J.C., Rodríguez E.G. (2007) Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25: 3752-3762.
- Ahuja** R.C., Caruso P. L., Möbius D. (1994) Counterion specific interactions in dioctadecyldimethylammonium bromide monolayers at the monolayer/subphase interface. *Thin Solid Films*, 242: 195-200.
- Akao** T., Fukumoto T., Ihara H. E., Ito A. (1996) Conformational changes in DNA induced by cationic bilayer membranes. *FEBS Lett.*, 391: 215-218.
- Andersson** M., Hammarström L., Edwards K. (1995) Effect of bilayer phase transitions on vesicle structure and its influence on the kinetics of viologen reduction. *J. Phys. Chem.*, 99: 14531-14538.
- Araujo** F.P, Petri D.F.S., Carmona-Ribeiro A.M. (2005) Colloid stability sodium dihexadecyl phosphate /poly (diallyldimethylammonium chloride) decorated latex. *Langmuir*, 21: 9495-9501.
- Banchereau** J., Steinman R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-252.
- Bangham** A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13: 238-252.
- Barreleiro** P.C.A., Olofsson G., Alexandridis P. (2000) Interaction of DNA with cationic vesicles: a calorimetric study. *J. Phys. Chem. B*, 104: 7795-7802.
- Barteau** B., Chèvre R., Letrou-Bonneval E., Labas R., Lambert O., Pitard O. (2008) Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr. Gene Ther.*, 8: 313-323.
- Bauer** S., Kirschning C.J., Häcker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9237-9242.
- Beeley** J.A., Stevenson S.M., Beeley J.G. (1972) Polyacrylamide gel isoelectric focusing of proteins: determination of isoelectric points using an antimony electrode. *Biochim. Biophys. Acta*, 285: 293-300.
- Benatti** C.R., Barroso R.P., Loney C., Ruysschaert J.M., Lamy M.T. (2009) DNA alters the bilayer structure of cationic lipid diC14-amidine: a spin label study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788: 1304-1309.
- Benatti** C.R., Epand R.M., Lamy M.T. (2007) Low cholesterol solubility in DODAB liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 145: 27-36.

Benatti C.R., Feitosa E., Fernandez R.M., Lamy-Freund M.T. (2001) Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels. *Chem. Phys. Lipids*, 111: 93-104.

Bennett C.F., Chiang M.Y., Chan H., Shoemaker J.E.E., Mirabelli C.K. (1992) Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.*, 41: 1023-1033.

Blandamer M.J., Briggs B., Cullis P.M., Engberts J.B.F.N., Kacperska A. (1995) Vesicle-surfactant interactions: effects of added surfactants on the gel to liquid-crystal transition for two vesicular systems. *J. Chem Soc. Faraday Trans.*, 91: 4275-4278.

Blandamer M.J., Briggs B., Cullis P.M., Green J.A., Waters M., Soldi G., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. (1992) Differential scanning microcalorimetric study of vesicles in aqueous solutions formed by dimethyldioctadecylammonium bromide. *J. Chem Soc. Faraday Trans.*, 88: 3431-3434.

Bluestone J.A., Mackay C.R., O'Shea J.J., Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 811-816.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Braun C., Jas G.S., Choosakoonkriang S., Koe G.S., Smith J.G., Middaugh C.R. (2003) The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes. *Biophys. J.*, 84: 1114-1123.

Breaker R.R. (2004) Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology. *Nature*, 432: 838-845.

Brgles M., Jurasin D., Sikiric M.D., Frkanec R., Tomasic J. (2008) Entrapment of ovalbumin into liposomes – factors affecting entrapment efficiency, liposome size, and zeta potential. *J. Liposome Res.*, 18: 235-248.

Brito R.O., Marques E.F. (2005) Neat DODAB vesicles: effect of sonication time on the phase transition thermodynamic parameters and its relation with incomplete chain freezing. *Chem. Phys. Lipids*, 137: 18-28.

Brown M.D., Schätzlein A.G., Uchegbu I.F. (2001) Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.*, 229: 1-21.

Brumm T., Jorgensen K., Mouritsen O.G., Bayerl T.M. (1996) The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoil-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/ distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biophys. J.*, 70: 1373-1379.

Bustamante C., Tinoco Jr. I., Maestre M.F. (1983) Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3568-3572.

Campanhã M.T.N., Mamizuka E.M., Carmona-Ribeiro A.M. (1999) Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J. Lipid Res.*, 40: 1495-1500.

Campanhã M.T.N., Mamizuka E.M., Carmona-Ribeiro A.M. (2001) Interactions between cationic vesicles and *Candida albicans*. *J. Phys. Chem. B*, 105: 8230-8236.

Campolongo M.J., Tan S.J., Xu J., Luo D. (2010) DNA nanomedicine: engineering DNA as a polymer for therapeutic and diagnostic applications. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 62: 606-616.

Carmona-Ribeiro A.M. (1992) Synthetic amphiphile vesicles. *Chem. Soc. Rev.*, 21: 209-214.

Carmona-Ribeiro A.M. (1993) Interactions between charged spheric vesicles. *J. Phys. Chem.*, 97: 11843-11846.

Carmona-Ribeiro A.M. (2003) Bilayer-forming synthetic lipids: drugs or carriers? *Curr. Med. Chem.*, 10: 2425-2446.

Carmona-Ribeiro A.M. (2006) Lipid bilayer fragments and disks in drug delivery. *Curr. Med. Chem.*, 13: 1359-1370.

Carmona-Ribeiro A.M. (2010) Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 249-259.

Carmona-Ribeiro A.M., Castuma C.E., Sesso A., Schreier S. (1991) Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions. *J. Phys. Chem.*, 95: 5361-5366.

Carmona-Ribeiro A.M., Chaimovich H. (1983) Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 733:172-179.

Carmona-Ribeiro A.M., Chaimovich H. (1986) Salt-induced aggregation and fusion of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate vesicles. *Biophys. J.*, 50: 621-628.

Carmona-Ribeiro A.M., Midmore B.R. (1992) Surface potential in charged synthetic amphiphile vesicles. *J. Phys. Chem.*, 96: 3542-3547.

Carmona-Ribeiro A.M., Ortis F., Schumacher R.I., Armelin M.C.S. (1997) Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir*, 13: 2215-2218.

Carmona-Ribeiro A.M., Yoshida L.S., Chaimovich H. (1985) Salt effects on stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecyl phosphate vesicles. *J. Phys. Chem.*, 89: 2928-2933.

- Carmona-Ribeiro** A.M., Yoshida L.S., Sesso A., Chaimovich H. (1984) Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. *J. Colloid Interface Sci.*, 100: 433-443.
- Carter** D.C., Ho J.X. (1994) Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 45: 153-203.
- Carvalho** L.A., Carmona-Ribeiro A.M. (1998) Interactions between cationic vesicles and serum proteins. *Langmuir*, 14: 6077-6081.
- Cherkasova** E.A., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Chumakov K.M., Agol V.I. (2002) Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.*, 76: 6791-6799.
- Ciani** L., Casini A., Gabbiani C., Ristori S., Messori L., Martini G. (2007) DOTAP/DOPE and DC-CHOL/DOPE lipoplexes for gene delivery studied by circular dichroism and other biophysical techniques. *Biophys. Chem.*, 127: 213-220.
- Cocquyt** J., Olsson U., Olofsson G., Van der Meeren, P. (2004) Temperature quenched DODAB dispersions: fluid and solid state coexistence and complex formation with oppositely charged surfactant. *Langmuir*, 20: 3906-3912.
- Cocquyt** J., Olsson U., Olofsson G., Van der Meeren, P. (2005) Thermal transitions of DODAB vesicular dispersions. *Colloid Polym. Sci.*, 283: 1376-1381.
- Cooper** C.L., Davis H.L., Morris M.L., Efler S.M., Al Adhami M., Krieg A.M., Cameron D.W., Heathcote J. (2004) CPG7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B[®] HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J. Clin. Immunol.*, 24: 693-701.
- Cornélie** S., Hoebeke J., Schacht A.M., Bertin B., Vicogne J., Capron M., Riveau G. (2004) Direct evidence that Toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J. Biol. Chem.*, 279: 15124-15129.
- Correia** F.M., Petri D.F.S., Carmona-Ribeiro A.M. (2004) Colloid stability of lipid/polyelectrolyte decorated latex. *Langmuir*, 20: 9535-9540.
- Cuccovia** I.M., Aleixo R.M., Mortara R.A., Filho P.B., Bonilha J.B.S., Quina F.H., Chaimovich H. (1979) Effect of dialkyldimethylammonium vesicles on the thiolysis of p-nitrophenyl acetate. *Tetrahedron Lett.*, 20: 3065-3068.
- Cuccovia** I.M., Kawamuro M.K., Krutman M.A.K., Chaimovich H. (1989) Control of reaction rates in vesicular systems. *J. Am Chem. Soc.*, 111: 365-366.
- D'Andrea** A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G. (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer stimulatory factor /IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, 178: 1041-1048.
- Dailey** M.O., Hunter R.L. (1974) The role of lipid in the induction of hapten-specific delayed hypersensitivity and contact sensitivity. *J. Immunol.*, 112: 1526-1534.

Davidson J., Rosenkrands I., Christensen D., Vangala A., Kirby D., Perrie Y., Agger E.M., Andersen P. (2005) Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate) – a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1718: 22-31.

Dean N.M. (2001) Functional genomics and target validation approaches using antisense oligonucleotide technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12: 622-625.

De-Backer M.D., Nelissen B., Logghe M., Viaene J., loonen I., Vandoninck S., de-Hoogt R., Dewaele S., Simons F.A., Verhasselt P., Vanhoof G., Contreras R., Luyten W.H. (2001) Na antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nat. Biotechnol.*, 19: 235-241.

Demeure C.E., Wu C.Y., Shu U., Schneider P.V., Heusser C., Yssel H., Delespesse G. (1994) In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocyte clones. II. Cytokines present at priming modulate the development of lymphokine production. *J. Immunol.*, 152: 4775-4782.

Donnelly S., Loscher C.E, Lynch M.A., Mills K.H. (2001) Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1 beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infect. Immun.*, 69: 4217-4223.

Feitosa E., Barreleiro P.C.A., Olofsson G. (2000) Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. *Chem. Phys. Lipids*, 105: 201-213.

Feitosa E., Brown W. (1997) Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide. *Langmuir*, 13: 4810-4816.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413-7417.

Fendler J. (1980) Surfactant vesicles as membrane mimetic agents – characterization and utilization. *Acc. Chem. Res.*, 13: 7-13.

Fichou Y., Férec C. (2006) The potential of oligonucleotides for therapeutic applications. *Trends Biotechnol.*, 24: 563-570.

Finkelman F.D., Katona I.M., Mosmann T.R., Coffman R.L. (1988) IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.*, 140: 1022-1027.

Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Morris S.C., Gildea L., Strait R., Madden K.B., Schopf L., Urban J.F. (2004) Interleukin-4- and interleukin-13- mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.*, 201: 139-155.

Florindo H.F., Pandit S., Gonçalves L.M.D., Videira M., Alpar O., Almeida A. (2009) Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres. *Biomaterials*, 30:5161-5169.

Foged C., Brodin B., Frokjaer S., Sundblad A. (2005) Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int. J. Pharm.*, 298: 315-322.

Gajewski T.F., Fitch F.W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper lymphocyte clones. *J. Immunol.*, 140: 4245-4252.

Galbraith W.M., Hobson W.C., Giclas P.C., Schechter P.J., Agrawal S. (1994) Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res. Dev.*, 4: 201-206.

Gall D. (1966) The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. *Immunology*, 11: 369-386.

Gamper H.B., Parekh H., Rice M.C., Bruner M., Youkey H., Kmiec E.B. (2000) The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res.*, 28: 4332-4339.

Gittings M.R., Saville D.A. (1998) The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements. *Colloids Surf., A*, 141: 111-117.

Glenny A.T., Pope C.G., Waddington H., Wallace V. (1926) The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J. Path. Bact.*, 29: 31-40.

Grabowski E.F., Morrison I.D. (1983) Particle size distributions from analysis of quasi-elastic light scattering data in Measurements of suspended particles by quasi-elastic light scattering, B. Dahneke (Ed.), Wiley-Interscience, New York.

Gregoriadis G. (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.*, 13: 527-537.

Guschlbauer W., Courtois Y. (1968) pH induced changes in optical activity of guanine nucleosides. *FEBS Lett.*, 1: 183-186.

Halperin S.A., Van Nest G., Smith B., Abtahi S., Whiley H., Eiden J.J. (2003) A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*, 21: 2461-2467.

Hammarström L., Velikian I., Karlsson G., Edwards K. (1995) Cryo-TEM evidence: sonication of dihexadecyl phosphate does not produce closed bilayer with smooth curvature. *Langmuir*, 11: 408-410.

Hart S.L. (2005) Lipid carriers for gene therapy. *Curr. Drug Delivery*, 2: 423-428.

Hartmann G., Weeratna R.B., Ballas Z.K., Payette P., Blackwell S., Suparto I., Rasmussen W.L., Waldschmidt M., Sajuthi D., Purcell R.H., Davis H.L., Krieg A.M. (2000) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, 164: 1617-1624.

Heinzel F.P., Sadick M.D., Mutha S.S., Locksley R.M. (1991) Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7011-7015.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408: 740-745.

Henriksen-Lacey M., Bramwell V.W., Christensen D., Agger E.M., Andersen P., Perrie Y. (2010) Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. *J. Controlled Release*, 142: 180-186.

Henry S.P., Beattie G., Yeh G., Chappel A., Giclas P., Mortari A., Jagels M.A., Kornbrust D.J., Levin A.A. (2002) Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Int. Immunopharm.*, 2: 1657-1666.

Henry S.P., Giclas P.C., Leeds J., Pangburn M., Auletta C., Levin A.A., Kornbrust D.J. (1997) Activation of the alternative pathway of complement by phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 281: 810-816.

Hilgers L.A., Snippe H. (1992) DDA as an immunological adjuvant. *Res. Immunol.*, 143: 494-503.

Hillaireau H., Couvreur P. (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 2873-2896.

Hubert D.H.W., Jung M., German A.L. (2000) Vesicle templating. *Adv. Mater.*, 12: 1291-1294.

Ilarduya C.T., Sun Y., Düzgünes N. (2010) Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40: 159-170.

Inaba K., Inaba M., Naito M., Steinman R.M. (1993) Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 178: 479-488.

Isogawa M., Robek M.D., Furuichi Y., Chisari F.V. (2005) Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Virol.*, 79: 7269-7272.

Israelachvili J.N. (1992) Intermolecular and surface forces, 2nd Ed., Academic Press, London.

Jääskeläinen I., Sternberg B., Mönkkönen J., Urtti A. (1998) Physicochemical and morphological properties of complexes made of cationic liposomes and oligonucleotides. *Int. J. Pharm.*, 167: 191-203.

Johnson Jr. W.C. (1996) Determination of the conformation of nucleic acids by electronic CD *in* Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, Gerald D. Fasman (Ed.), Plenum Press, New York.

Juliano R., Alam M.R., Dixit V., Kang H. (2008) Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 36: 4158-4171.

Kabanov V.A., Yaroslavov A.A. (2002) What happens to negatively charged lipid vesicles upon interacting with polycation species? *J. Controlled Release*, 78:267-271.

Katz D., Kraaijeveld C.A., Snippe H. (1995) Synthetic lipid compounds as antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killed-virus vaccines *in* Theory and practical application of adjuvants, D.E.S. Stewart-Tull (Ed.), John Wiley & Sons Ltd., New York.

Katz D., Lehrer S., Galan O., Lachmi B.E., Cohen S. (1991) Adjuvant effects of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody, antibody-isotype and delayed-type hypersensitivity responses to Semliki Forest virus in mice. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 76: 305-320.

Katz D.S., Inbar I., Samina I., Peleg B.A., Heller D.E. (1993) Comparison of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, Freund's complete adjuvant and mineral oil for induction of humoral antibodies, cellular immunity and resistance to Newcastle disease virus in chickens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 7: 303-313.

Kawai C., Prado F.M., Nunes G.L.C., DiMascio P., Carmona-Ribeiro A.M., Nantes I.L. (2005) pH-dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes. *J. Biol. Chem.*, 280: 34709-34717.

Kazzaz J., Neidleman J., Singh M., Ott G., O'Hagan D.T. (2000) Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *J. Controlled Release*, 67: 347-356.

Kikuchi I.S., Carmona-Ribeiro A.M. (2000) Interactions between DNA and synthetic cationic liposomes. *J. Phys. Chem.*, 104: 2829-2835.

Kikuchi I.S., Viviani W., Carmona-Ribeiro A.M. (1999) Nucleotide insertion in cationic bilayers. *J. Phys. Chem. A*, 103: 8050-8055.

Kline J.N., Kitagaki K., Businga T.R., Jain V.V. (2002) Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 283: L170-L179.

Klinman D.M., Barnhart K.M., Conover J. (1999) CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*, 17: 19-25.

Klinman D.M., Klaschik S., Sato T., Tross D. (2009) CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 61: 248-255.

Kopf M., Brombacher F., Köhler G., Kienzle G., Widmann K.H., Lefrang K., Humborg C., Ledermann B., Solbach W. (1996) IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, 184: 1127-1136.

Korenaga M., Hitoshi Y., Yamaguchi N., Sato Y., Takatsu K., Tada I. (1991) The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology*, 72: 502-507.

Korsholm K.S., Agger E.M., Foged C., Christensen D., Dietrich J., Andersen C.S., Geisler C., Andersen P. (2007) The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology*, 121: 216-226.

Korsholm K.S., Petersen R.V., Agger E.M., Andersen P. (2009) T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology*, 129: 75-86.

Kotz J.C., Treichel P. (1999) Chemistry and Chemical Reactivity, 4th Edition. Saunders College Publishing, Orlando.

Kraaijeveld C.A., La Rivière G., Benaissa-Trouw B.J., Jansen J., Harmsen T., Snippe H. (1983) Effect of the adjuvant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide on the humoral and cellular immune responses to encephalomyocarditis virus. *Antiviral Res.*, 3: 137-149.

Kraaijeveld C.A., Snippe H., Harmsen M., Khader Boutahar-Trouw B. (1980) Dimethyl dioctadecyl ammoniumbromide as an adjuvant for delayed type hypersensitivity and cellular immunity against Semliki Forest virus in mice. *Arch. Virol.*, 65: 211-217.

Krieg A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 709-760.

Krieg A.M. (2003) CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.*, 9: 831-835.

Krieg A.M. (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 5: 471-484.

Krieg A.M., Guga P., Stec W. (2003b) P-chirality-dependent immune activation by phosphorothioate CpG oligodeoxynucleotides. *Oligonucleotides*, 13: 491-499.

Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374: 546-549.

Kunitake T., Okahata Y., Tamaki K., Kumamaru F., Takayanagi M. (1977) Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts. *Chem. Lett.*, 6: 387-390.

Kuramoto Y., Nishikawa M., Hyoudou K., Yamashita F., Hashida M. (2006) Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex. *J. Controlled Release*, 115: 226-233.

- Lai Y.H., Mosmann T.R.** (1999) Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J. Immunol.*, 162: 78-87.
- Lee A.G.** (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams: I. Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 472: 237-281.
- Lee K.Y., Kwon I.C., Kim Y.H., Jo W.H., Jeong S.Y.** (1998) Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J. Controlled Release*, 51: 213-220.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983.
- Li J., Lu Y.** (2000) A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions. *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 10466-10467.
- Li L., Xia Y., Nguyen A., Lai Y.H., Feng L., Mosmann T.R., Lo D.** (1999) Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J. Immunol.*, 162: 2477-2487.
- Li S.D., Huang L.** (2006) Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.*, 13: 1313-1319.
- Liew F.Y.** (2002) Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.*, 2: 55-60.
- Lin L., Gerth A.J., Peng S.L.** (2004) CpG DNA redirects class-switching towards “Th1-like” Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *European J. Immunol.*, 34: 1483-1487.
- Lincopan N., Espíndola .M., Vaz A.J., Costa M.H.B., Faquim-Mauro E., Carmona-Ribeiro A.M.** (2009) Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: preparation, characterization and activity in vivo. *Vaccine*, 27: 5760-5771.
- Lincopan N., Santana M.R.A., Faquim-Mauro E., Costa M.H.B., Carmona-Ribeiro A.M.** (2009b) Silica-based cationic bilayers as immunoadjuvants. *BMC Biotechnology*, 9: 1-19.
- Lindblad E.B.** (2004) Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. *Vaccine*, 22: 3658-3668.
- Lipford G.B., Sparwasser T., Zimmermann S., Heeg K., Wagner H.** (2000) CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J. Immunol.*, 165: 1228-1235.
- Liu J., Lu Y.** (2005) Stimuli-responsive disassembly of nanoparticle aggregates for light-up colorimetric sensing. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 12677-12683.
- Lucaks N.W., Strieter R.M., Chensue S.W., Kunkel S.L.** (1994) Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in murine model of asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 10: 526-532.

Macedo M.S., Faquim-Mauro E., Ferreira A.P., Abrahamsohn I. A. (1998) Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies. *Scandinavian J. Immunol.*, 47: 10-18.

Malamud D., Drysdale J.W. (1978) Isoelectric point of proteins: a table. *Anal. Biochem.*, 86: 620-647.

Maldonado-López R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., Heirman C., Thielemans K., Leo O., Urbain J., Moser M. (1999) CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.*, 189: 587-592.

Manegold C., Gravenor D., Woytowitz, Mezger J., Hirsh V., Albert G., Al-Adhami M., Readett D., Krieg A.M., Leichman C.G. (2008) Randomized Phase II Trial of a Toll-Like Receptor 9 Agonist Oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in Combination With First-Line Taxane Plus Platinum Chemotherapy for Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 26: 3979-3986.

Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachman M.F. (2008) Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European J. Immunol.*, 38: 1404-1413.

Mao D., Wallace B.A. (1984) Differential light scattering and absorption flattening optical effects are minimal in the circular dichroism spectra of small unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 23: 2667-2673.

Marra J. (1986) Effects of counterion specificity on the interactions between quaternary ammonium surfactants in monolayers and bilayers. *J. Phys. Chem.*, 90: 2145-2150.

Marwick C. (1998) First “antisense” drug will treat CMV retinitis. *JAMA*, 280: 871.

Mason J.T. (1998) Investigation of phase transitions in bilayer membranes. *Meth. Enzymol.*, 295: 468-494.

Masotti A., Moretti F., Mancini F., Russo G., Di Lauro N., Checchia P., Marianecci C., Carafa M., Santucci E., Ortaggi G. (2007) Physicochemical and biological study of selected hydrophobic polyethylenimine-based polycationic liposomes and their complexes with DNA. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 1504-1515.

Mbow M.L., De Gregorio E., Valiante N.M., Rappuoli R. (2010) New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*, 22: 411-416.

McDonald C.C., Phillips W.D., Penman S. (1964) Nucleic acids: a nuclear magnetic resonance study. *Science*, 144: 1234-1237.

McLaughlin S. (1989) The electric properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18: 113-36.

- Meidan** V.M., Cohen J.S., Amariglio N., Hirsch-Lerner D., Barenholz Y. (2000) Interaction of oligonucleotides with cationic lipids: the relationship between electrostatics, hydration and state of aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1464: 251-261.
- Meidan** V.M., Glezer J., Amariglio N., Cohen J.S., Barenholz Y. (2001) Oligonucleotide lipoplexes: the influence of oligonucleotide composition on complexation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1568: 177-182.
- Merino** E.J., Weeks K.M. (2005) Facile conversion of aptamers into sensors using a 2'-ribose-linked fluorophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 12766-12767.
- Mislick** K.A., Baldeschwieler J.D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12349-12354.
- Mitrakos** P., McDonald P.M. (2000) Nucleotide chain length and the morphology of complexes with cationic amphiphiles: ^{31}P -NMR observations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1463: 355-373.
- Molitor** T.W., Joo H.S., Thacher B.J. (1984) Potentiating effect of adjuvants on humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. *Vet. Microbiol.*, 10: 209-218.
- Mönkkönen** J., Urtti A. (1998) Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 34: 37-49.
- Moser** M., Leo O. (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28S: C2-C13.
- Mosmann** T.R., Cherwinsky H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136: 2348-2357.
- Moura** S.P., Carmona-Ribeiro A.M. (2003) Cationic bilayer fragments on silica at low ionic strength: competitive adsorption and colloid stability. *Langmuir*, 19: 6664-6667.
- Mucha** A., Knobloch B., Bojczuk M.J., Kozłowski H., Sigel R.K. (2008) Comparison of the acid-base properties of ribose and 2'-Deoxyribose nucleotides. *Chem. Eur. J.*, 14: 6663-6671.
- Murakami** Y., Maeda M. (2005) DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell. *Biomacromolecules*, 6: 2927-2929.
- Nakanishi** T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T. (1997) Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240: 793-797.
- Nantes** I.L., Correia F.M., Faljoni-Alario A., Kawanami A.E., Ishiki H.M., Amaral A.T., Carmona-Ribeiro A.M. (2003) Nucleotide conformational change induced by cationic bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 416: 25-30.
- Nascimento** D.B., Rapuano R., Lessa M.M., Carmona-Ribeiro A.M. (1998) Counterion effects on properties of cationic vesicles. *Langmuir*, 14: 7387-7391.

- Navani N.K.**, Li Y. (2006) Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10: 272-281.
- Nisbet A.D.**, Saundry R.H., Moir A.J.G., Fothergill L.A., Fothergill J.E. (1981) The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.*, 115: 335-345.
- O'Hagan D.T.**, De Gregorio E. (2009) The path to a successful vaccine adjuvant – “The long and winding road”. *Drug Discov. Today*, 14: 541-551.
- O'Hagan D.T.**, Valiante N.M. (2003) Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2: 727-735.
- Orava E.W.**, Cicmil N., Gariépy J. (2010) Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798: 2190-2200.
- Pacheco L.F.**, Carmona-Ribeiro A.M. (2003) Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. *J. Colloid Interface Sci.*, 258: 146-154.
- Pack D.W.**, Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4:581-593.
- Pansu R.B.**, Arrio B., Roncin J., Faure J. (1990) Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. *J. Phys. Chem.*, 94: 796-801.
- Parish C.R.** (1971) Immune response to chemically modified flagellin. II. Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.*, 134: 21-47.
- Patel J.D.**, Gandhapudi S., Jones J., O'Carra R., Woodward J.G., Mumper R.J. (2007) Cationic nanoparticles for delivery of CpG oligodeoxynucleotide and ovalbumin: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3: 97-106.
- Pecora R.** (2000) Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2:123-131.
- Peek L.J.**, Middaugh C.R., Berkland C. (2008) Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60: 915-928.
- Phan A.T.**, Kuryavyi V., Ma J.B., Faure A., Adréola M.L., Patel D.J. (2005) An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 634-639.
- Prager M.D.**, Kanar M.C., Farmer J.L., Vanderzee J. (1985) Effect of dimethyl-dioctadecyl-ammonium-bromide induced macrophages on malignant cell proliferation. *Cancer Lett.*, 27: 225-235.
- Reis e Sousa C.**, Stahl P.D., Austyn J.M. (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 178: 509-519.

Rettig L., Haen S.P., Bitterman A.G., von Boehmer L., Curioni A., Krämer S.D., Knuth A., Pascolo S. (2010) Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood*, 115: 4533-4541.

Rice-Ficht A.C., Arenas-Gamboa A.M., Kahl-McDonagh M.M., Ficht T.A. (2010) Polymeric particles in vaccine delivery. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13: 106-112.

Romagne, F. (2007) Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov. Today*, 12: 80-87.

Rosa H., Petri D.F.S., Carmona-Ribeiro A.M. (2008) Interactions between bacteriophage DNA and cationic biomimetic particles. *J. Phys. Chem.*, 112: 16422-16430.

Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5: 494-496.

Ruponen M., Rönkkö S., Honkakoski P., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A. (2001) Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J. Biol. Chem.*, 276: 33875-33880.

Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S. (2004) Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European J. Immunol.*, 34: 2541-2550.

Sallusto F., Lanzavecchia A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.*, 182: 389-400.

Saveyn P., Van der Meeren P., Cocquyt J., Drakenberg T., Olofsson G., Olsson U. (2007) Incomplete lipid chain freezing of sonicated vesicular dispersions of double-tailed ionic surfactants. *Langmuir*, 23: 10455-10462.

Saveyn P., Van der Meeren P., Zackrisson M., Narayanan T., Olsson U. (2009) Subgel transition in diluted vesicular DODAB dispersions. *Soft Matter*, 5: 1735-1742.

Scarpa M.V., Maximiano F.A., Chaimovich H., Cuccovia I.M. (2002) Interfacial concentrations of chloride and bromide and selectivity for ion exchange in vesicles prepared with dioctadecyldimethylammonium halides, lipids and their mixtures. *Langmuir*, 18: 8817-8823.

Schales O., Schales S.S. (1941) A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 140: 879-884.

Schenkman S., Araujo P.S., Dijkman R., Quina F.H., Chaimovich H. (1981) Effects of temperature and lipid composition on the serum albumin-induced aggregation and fusion of small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 649: 633-641.

Schneider M.F., Marsh D., Jahn W., Kloesgen B., Heimburg T. (1999) Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 14312-14317.

Sennato S., Bordi F., Cametti C., Diociaiuti M., Malaspina P. (2005) Charge patch attraction and reentrant condensation in DNA-liposome complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1714: 11-24.

Shaw D.J. (1970) Introduction to colloid and surface chemistry. Butterworth & Co. Publishers Ltd., London.

Shi F., Hoekstra D. (2004) Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J. Controlled Release*, 97: 189-209.

Shi H.Z., Li C.Q., Qin S.M., Xie Z.F., Liu Yi. (1999) Effect of inhaled interleukin-5 on number and activity of eosinophils in circulation from asthmatics. *Clin. Immunol.*, 91: 163-169.

Silverman S.K. (2009) Deoxyribozymes: selection design and serendipity in the development of DNA catalysts. *Acc. Chem. Res.*, 42: 1521-1531.

Simons F.E.R., Shikishima Y., Van Nest G., Eiden J.J., HayGlass K.T. (2004) Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113: 1144-1151.

Singh M., Kazzaz J., Chesko J., Soenawan E., Ugozzoli M., Giuliani M., Pizza M., Rappuoli R., O'Hagan D.T. (2004) Anionic microparticles are a potent delivery system for recombinant antigens from *Neisseria meningitidis* serotype B. *J. Pharmaceut. Sci.*, 93: 273-282.

Singh M., Ugozzoli M., Kazzaz J., Chesko J., Soenawan E., Mannucci D., Titta F., Contorni M., Volpini G., Del Giudice G., O'Hagan D.T. (2006) A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine*, 24: 1680-1686.

Smith R.H., Ziola B. (1986) Cyclophosphamide and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide immunopotentiates the delayed type hypersensitivity response to inactivated enveloped viruses. *Immunology*, 58: 245-250.

Snapper C.M., Paul W.E. (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236: 944- 947.

Snippe H., Belder M., Willers J.M. (1997) Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide as adjuvant for delayed hypersensitivity in mice. *Immunology*, 33: 931-936.

Snippe H., Johannesen L., Inman J.K., Merchant B. (1978) Specificity of murine delayed type hypersensitivity to conjugates of large or small haptens on protein carriers bearing lipid groups. *Immunology*, 34: 947-953.

- Snippe H.**, Willers J.M.N., Inman J.K., Mercant B. (1980) The specificity of antibody formation in mice following immunization with hapten-carrier complexes mixed with the surfactant, dimethyl-dioctadecyl-ammonium-bromide. *Immunology*, 39: 362-365.
- Somerharju P.** (2002) Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids*, 116: 57-74.
- Sparwasser T.**, Vabulas R.M., Villmow B., Lipford G.B., Wagner H. (2000) Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur. J. Immunol.*, 30: 3591-3597.
- Spellberg B.**, Edwards J.E. (2001) Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.*, 32: 76-102.
- Stamm L.M.**, Räisänen-Sokolowski A., Okano M., Russell M.E., David J.R., Satoskar A.R. (1998) Mice with STAT6-targeted gene disruption develop a Th1 response and control cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, 161: 6180-6188.
- Stanfield I.P.**, Gall D., Bracken P.M. (1973) Single-dose antenatal tetanus immunization. *Lancet*, 301: 215-219.
- Steinman R.M.**, Banchereau J. (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449: 419-426.
- Stevens T.L.**, Bossie A., Sanders V.M., Fernandez-Botran R., Coffman R.L., Mosmann T.R., Vitetta E.S. (1988) Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*, 334: 255-258.
- Stewart-Tull D.E.S.** (1991) The assessment and use of adjuvants in Vaccines, G. Gregoriadis (Ed.), Plenum Press, New York.
- Storni T.**, Kündig T.M., Senti G., Johansen P. (2005) Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57: 333-355.
- Svensson M.**, Stockinger B., Wick M.J. (1997) Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to cells. *J. Immunol.*, 158: 4229-4236.
- Sybachin A.V.**, Efimova A.A., Litmanovich E.A., Menger F.M., Yaroslavov A.A. (2007) Complexation of polycations to anionic liposomes: composition and structure of the interfacial complexes. *Langmuir*, 23:10034-10039.
- Tai T.**, Yamashita K., Ito S., Kobata A. (1977) Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and the difference in specificity of endo- β -N-acetylglucosaminidases C_{II} and H*. *J. Biol. Chem.*, 252: 6687-6694.
- Thiele L.**, Rothen-Rutishauser B., Jilek S., Wunderli-Allenspach H., Merkle H.P., Walter E. (2001) Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J. Controlled Release*, 76: 59-71.

Thomas M., Klibanov A.M. (2003) Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 27-34.

Tsuruta L.R., Quintilio W., Costa M.H.B., Carmona-Ribeiro A.M. (1997) Interactions between cationic liposomes and antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. *J. Lipid Res.*, 38: 2003-2011.

Veronesi R., Correa A., Alterio D. (1970) Single dose immunization against tetanus: promising results in human trials. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 12: 46-54.

Vieira D.B., Carmona-Ribeiro A.M. (2001) Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. *J. Colloid Interface Sci.*, 244: 427-431.

Vieira D.B., Pacheco L.F., Carmona-Ribeiro A.M. (2006) *J. Colloid Interface Sci.*, 293: 240-247.

Vogel A.I. (1979) Textbook of macro and semimicro qualitative inorganic analysis, 5th Edition. Longman Group Limited, London.

Vollmer J., Krieg A.M. (2009) Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 61: 195-204.

Walker H.W., Grant S.B. (1998) Influence of surface charge and particle size on the stabilization of colloidal particles by model polyelectrolytes. *Colloids Surf., A*, 135: 123-133.

Wallace B.A. (2009) Protein characterization by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Q. Rev. Biophys.*, 42: 317-370.

Wang L., Koynova R., Parikh H., MacDonald R.C. (2006) Transfection activity of binary mixtures of cationic O-substituted phosphatidylcholine derivatives: the hydrophobic core strongly modulates physical properties and DNA delivery efficacy. *Biophys. J.*, 91: 3692-3706.

Wasungu L., Hoekstra D. (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Controlled Release*, 116: 255-264.

Weeratna R.D., McCluskie M.J., Xu Y., Davis H. L. (2000) CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 18: 1755-1762.

Weisman S., Hirsch-Lerner D., Barenholz Y., Talmon Y. (2004) Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys. J.*, 87: 609-614.

Wiethoff C.M., Middaugh C.R. (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharmaceut. Sci.*, 92: 3692-3706.

Wiethoff C.M., Smith J.G., Koe G.S., Middaugh C.R. (2001) The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. *J. Biol. Chem.*, 276: 32806-32813.

Wilson C., Keefe, A.D. (2006) Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10: 607-614.

Wilson-Welder J.H., Torres M.P., Kipper M.J., Mallapragada S.K., Wannemuehler M.J., Narasimhan B. (2009) Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J. Pharmaceut. Sci.*, 98: 1278-1316.

Wischke C., Borchert H.H., Zimmermann J., Siebenbrodt I., Lorenzen D.R. (2006) Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J. Controlled Release*, 114: 359-368.

Xiang S.D., Scholzen A., Minigo G., David C., Apostopoulos V., Mottram P.L., Plebanski M. (2006) Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods*, 40: 1-9.

Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V. (1989) Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6454-6458.

Yang N., Mahato R.I. (2010) Delivery and targeting of oligonucleotides and siRNA in Targeted delivery of small and macromolecular drugs, Ajit S. Narang, Ram I. Mahato (Eds.), CRC Press, New York.

Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Lobyshev V.I., Kabanov V.A. (2002) Reversibility of structural rearrangements in the negative vesicular membrane upon electrostatic adsorption/desorption of the polycation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1560: 14-24.

Yaroslavov A.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavova E.G., Efimova A.A., Menger F.M. (2008) Polyelectrolyte-coated liposomes: stabilization of the interfacial complexes. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 142: 43-52.

Yi A.K., Chang M., Peckham D.W., Krieg A.M., Ashman R.F. (1998) CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.*, 160: 5898-5906.

Zaks K., Jordan M., Guth A., Sellins K., Kedl R., Izzo A., Bosio C., Dow S. (2006) Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J. Immunol.*, 176: 7335-7345.

Zamecnik P.C., Stephenson M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 280-284.

Zelphati O., Szoka F.C. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11493-11498.

Zimmermann S., Egeter O., Hausmann S., Lipford G.B., Röcken M., Wagner H., Heeg K. (1998) Cutting edge: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.*, 160: 3627-3630.

Ziola B., Smith R.H. (1987) T cell cross-reactivity among viruses of the Paramyxoviridae. *Virol. Immunol.*, 1: 111-119.

Zuidam N.J., Barenholz Y., Minsky A. (1999) Chiral DNA packing in DNA-cationic liposome assemblies. *FEBS Lett.*, 457: 419-422.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Julio Henrique Kravcuks Rozenfeld

Local e data de nascimento: São Paulo, 23 de Julho de 1981

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

Bacharelado em Ciências Biológicas2000-2003

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).....2004-2006

Título: “Estudo das bases moleculares da especificidade pelo substrato de uma beta-glicosidase (AF052729) de *Spodoptera frugiperda*”

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso: “Bioquímica dos Hormônios”

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2001

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPq, 2006-2010.

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Honra ao mérito pela redação produzida no Vestibular Unicamp 2000 sobre o tema “Água”, escolhida para publicação no livro “Redações do Vestibular Unicamp 2000”, Campinas – SP, 2000.

Prêmio de viagem “Biophysical Society Travel Award” concedido pela Biophysical Society durante o 3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology, São Sebastião – SP, 2010.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos Completos

Tomassi M.H., Rozenfeld J.H.K., Gonçalves L.M., Marana S.R. (2010) Characterization of the interdependency between residues that bind the substrate in a β -glycosidase, Braz. J. Med. Biol. Res., 43: 8-12.

Rozenfeld J.H.K., Oliveira T.R., Lamy M.T., Carmona-Ribeiro A.M. (2011) Interaction of cationic bilayer fragments with a model oligonucleotide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808: 649-655.

Resumos em Congressos

Schlögl P.S., Vincentz M., da Silva A.C., Jungmann L., Gerhardt I., Rozenfeld J.H.K., Leite A. (2002) Cloning, expression and purification of ATB2, an Arabidopsis bZIP transcription factor. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambu - MG. Abstract book, p. 56.

Rozenfeld J.H.K., Mendonça L.M.F., Marana S.R. (2005) Molecular basis of the substrate specificity in a beta-glycosidase. In: XXXIV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia – SP. Abstract book, p. 64.

Rozenfeld J.H.K., Marana S.R. (2006) Development and evaluation of a model to predict substrate specificity of a beta-glycosidase. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia – SP. CD Rom.

Tomassi M.H., Rozenfeld J.H.K., Marana S.R. (2007) Additivity of mutational effects on the catalytic activity of a beta-glycosidase. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq, Salvador – BA. CD Rom.

Rozenfeld J.H.K., Carmona-Ribeiro A.M. (2008) Effects of nucleotide and oligonucleotide on colloid stability and bilayer structure of cationic vesicles. In: XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, Águas de Lindóia - SP. CD Rom.

Rozenfeld J.H.K., Carmona-Ribeiro A.M. (2009) Compared Effects of Monovalent Salt, Mono- And Oligonucleotide On Structure And Stability of Cationic Vesicles. In: 13th IACIS International Conference on Surface & Colloid Science and 83rd ACS Colloid and Surface Science Symposium, New York – USA. Abstract book, p. 304. (**Apresentação Oral**)

Rozenfeld J.H.K., Carmona-Ribeiro A.M. (2010) Effects of nucleotide and oligonucleotide on colloid stability and bilayer structure of cationic bilayer fragments. In: XXXIX Reunião Anual da SBBq, Foz do Iguaçu – PR. CD Rom.

Rozenfeld J.H.K., Oliveira T.R., Lamy M.T., Carmona-Ribeiro A.M. (2010) Effects of monovalent salt, mono- and oligonucleotide on structure and stability of cationic vesicles. In: 3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology, São Sebastião – SP. Abstract book p. 63.

8- Anexo