

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICA**

**SÔNIA MARIA LUCAS DA SILVA**

**LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO COMPLEXO DE  
CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA PLASMIDIAL: OTIMIZAÇÃO DO  
MÉTODO DE PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
ESTUDO DE TRANSFEÇÃO**

**Belo Horizonte – MG  
2011**

**SÔNIA MARIA LUCAS DA SILVA**

**LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO COMPLEXO DE  
CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA PLASMIDIAL: OTIMIZAÇÃO DO  
MÉTODO DE PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
ESTUDO DE TRANSFEÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial, para a obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

**Belo Horizonte – MG  
2011**

**Dedico este trabalho àqueles que  
sempre estiveram ao meu lado:  
minha mãe Maria, meu esposo Severo  
e aos meus filhos Fernanda e Felipe**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, de forma muito especial, pela vida, por conduzir meus passos, me sustentar nas horas difíceis, por renovar, diariamente, o meu amor pela vida, me permitindo sentir a Sua presença e o Seu grande amor para com todos.

Ao meu marido Severo, minha referência de competência e força de vontade, e aos meus filhos Fernanda e Felipe, que enchem minha vida de amor e alegria.

À minha mãe Maria, companheira de todos os dias e minha referência de fé, e à toda minha família, pelo constante apoio, incentivo e torcida pelas minhas realizações.

À minha querida amiga Eld, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me ajudando em todas as fases deste trabalho. Obrigada pela amizade, incentivo e por ter dividido comigo as minhas atribuições no CEDAFAR.

À Profa. Dra Mônica Cristina de Oliveira, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, otimismo e amizade durante todo o decorrer desta jornada. Sinto-me agradecida e honrada por ter trabalhado em seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero, meu co-orientador, pela colaboração e amizade.

Aos professores do CEDAFAR, Dr. Gerson Antônio Pianetti e Dra. Cristina Duarte Vianna Soares por terem me permitido conciliar as minhas atribuições no CEDAFAR com as do doutorado.

Aos meus colegas do CEDAFAR, Nilton, Miriam, Tânia, Léo, Márcia, Edna, Lúcia, Luciano e Raíssa pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Leonor T. da Mata Machado do Departamento Fisiologia e Biofísica/ICB/UFMG pela sua disponibilidade e inestimável ajuda nos experimentos de cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Roberto Quinino ICEX/UFMG pela colaboração na realização do experimento fatorial.

À Profa. Dra. Letícia Coelho e os Drs Ângelo Malachias e Carlos Perez do LNLS pela colaboração na realização dos experimentos de EDXD.

Aos professores Alfredo Miranda de Góes e Dawidson Assis Gomes e às doutorandas Natássia Caroline Resende e Jerusa Quintão, do laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG, pela disponibilidade e inestimável colaboração na realização dos experimentos de transfecção.

À Profa. Dra. Vildete Aparecida Souza Carmo pela amizade e constante incentivo.

Ao Eduardo de Cássio Oliveira Reis, técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FAFAR/UFMG pelo constante apoio.

À todos os colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e à Dra Cláudia Salviano por toda colaboração e amizade.

À FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos,  
uma passagem do conhecido para o desconhecido.”*

*- Autor desconhecido -*

## RESUMO

Dentro do grupo dos vetores não virais, os lipossomas pH-sensíveis constituem uma alternativa interessante para ser utilizada na terapia gênica, pois em pH ácido, como ocorre no interior dos endossomas sofrem transição de fase, que conduz à desestabilização da bicamada lipídica, promovendo, assim, a liberação do material genético encapsulado. Este trabalho apresenta o desenvolvimento e a caracterização físico-química de lipossomas pH-sensíveis, compostos por DOPE:CHEMS (razão molar 6:4, respectivamente), contendo o plasmídeo pAct - capaz de expressar o gene da proteína activina, com propriedade de reduzir o crescimento celular do câncer de próstata. Estes lipossomas denominados LpAct foram produzidos pelo método de evaporação em fase reversa, após prévia complexação do plasmídeo pAct com moléculas da 6-monodesoxi-6-monoamina- $\beta$ -cyclodextrina ( $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+$ ), na razão de carga  $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+/\text{pAct}^-$  igual a  $^+1/^-1$ . O experimento fatorial completo  $2^4$  foi utilizado para avaliar a influência dos fatores velocidade de rotação, intensidade de vácuo, concentração de lípides e concentração de pAct sobre o teor de encapsulação de pAct nos lipossomas. Este estudo foi conduzido com o intuito de se estabelecer um protocolo de produção de LpAct de uma maneira racional. Dos fatores analisados, a intensidade do vácuo e a concentração do plasmídeo pAct foram os que mais influenciaram o aumento do teor de encapsulação de pAct nos lipossomas. De acordo com o estudo fatorial, o protocolo de produção de LpAct adotado para a otimização do teor encapsulado de pAct foi: o uso da velocidade de rotação a 120 rpm, da intensidade de vácuo a 300 mbar, concentração de lípides de 10 mM e concentração do plasmídeo pAct de 30  $\mu\text{g/mL}$ . O teor de pAct encapsulado com este protocolo foi cerca de 85% (25  $\mu\text{g/mL}$ ). A técnica de difração de raios X dispersiva em energia (EDXD) foi utilizada para investigar a organização supramolecular das moléculas do DOPE em relação à presença do complexo  $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+/\text{pAct}^-$ , dos componentes do meio de cultura e das proteínas do soro fetal bovino, nos pH 7,4 e 5,0. Em pH fisiológico, o estudo revelou que o complexo  $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+/\text{pAct}^-$  interage com a membrana lipídica dos lipossomas resultando na presença das fases lamelar e hexagonal. Entretanto, em pH 5,0, somente a fase hexagonal foi observada. Nos valores de pH 5,0 e 7,0, a presença

dos constituintes do meio de cultura e das proteínas conduziu à formação de estruturas menos ordenadas, no entanto, a pH-sensibilidade do sistema foi preservada. O método MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade dos LpAct sobre a linhagem de células de câncer de próstata – LNCaP. A capacidade de transfecção dos lipossomas nestas células foi investigada mediante a expressão da proteína verde fluorescente (EGFP). O estudo contemplou a avaliação dos tempos de transfecção de 4, 6, 24 e 48 horas e a presença ou não de soro fetal bovino. De acordo com os resultados os LpAct foram capazes de transfectar as células LNCaP, porém de forma menos eficiente que o agente de transfecção catiônico utilizado como controle (Lipofectamina™ 2000).

**Palavras-chave:** terapia gênica, lipossomas aniônicos pH-sensíveis, experimento fatorial, EDXD, EGFP, activina, citotoxicidade, células LNCaP.

## ABSTRACT

Among non-viral vectors, pH-sensitive liposomes are an attractive alternative in gene therapy, because they undergo a phase transition, leading to destabilization of the bilayer and release of encapsulated material at acid pH, as it occurs within the endosoma. In this paper, we report the development of pH-sensitive liposomes composed of DOPE:CHEMS (molar ratio 6:4, respectively) containing pAct plasmid - able to express the gene of activin - which reduces prostate cancer cell growth. These liposomes, called LpAct, were produced by reverse phase method, and pAct plasmid was previously complexed with 6-monodeoxy-6-monoamine- $\beta$ -cyclodextrin ( $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+$ ) at a 1/1 charge ratio (+/-). The  $2^4$  full factorial design was used to evaluate the influence of rotation speed, vacuum intensity, total lipid concentration and DNA concentration on encapsulation efficiency of pAct in liposomes. According to the results, the intensity of the vacuum and the pAct concentration were the main factors affecting the encapsulation of pAct in liposomes. This study allowed to establish the optimal conditions to the production of LpAct. These conditions are: rotation speed of 120 rpm, vacuum intensity of 300 mbar, lipid concentration of 10 mM and pAct concentration of 30  $\mu\text{g/mL}$ . The percentage of pAct encapsulated was approximately 85% (25  $\mu\text{g/mL}$ ) using this protocol. Energy dispersive X-ray diffraction (EDXD) was used to investigate the supramolecular organization of DOPE molecules in the presence of  $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+/\text{pAct}^-$ , culture medium components and proteins of fetal bovine serum, at pH 7.4 and 5.0. At physiological pH, the study revealed that the  $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+/\text{pAct}^-$  complex interacts with the lipid membrane resulting in the presence of lamellar and hexagonal phases. However, at pH 5.0, only the hexagonal phase was observed. At pH 5.0 and 7.0, the presence of the culture medium components and proteins led to the formation of less ordered structures, however, the pH-sensitivity of the system was maintained. The MTT method was used to evaluate the cytotoxicity of LpAct on prostate cancer cell line LNCaP. The transfection capacity of LpAct in these cells was investigated by expression of green fluorescent protein (EGFP). This study included the evaluation of different time intervals of transfection (4, 6, 24 and 48 hours) and the influence of the presence of fetal bovine serum. According to the

results, LpAct were able to transfect LNCaP cells, but with lower efficiency than that observed with cationic liposomes used as control (Lipofectamine™ 2000).

**Key words:** gene therapy, anionic pH-sensitive liposomes, factorial design, EDXD, EGFP, activin, cytotoxicity, LNCaP cells.

## LISTA DE FIGURAS

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1    | Esquema do processo de obtenção dos LpAct.....  | 21 |
| 2    | Estrutura química das moléculas de DOPE e CHEMS e esquema da formação das fases lamelar e hexagonal da DOPE .....   | 36 |
| 3    | Esquema de obtenção de $\beta$ -CDPs de acordo com Hwang e colaboradores (2001). .....  | 39 |
| 4    | Estrutura química de derivados aminados de ciclodextrinas utilizados por Cryan e colaboradores (2004) .....   | 40 |
| 1.1  | Esquema do experimento fatorial $2^4$ para estudo da influência dos fatores tecnológicos e de formulação sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct ..... | 54 |
| 1.2  | Esquema para a determinação de pAct nas amostras dos LpAct preparados de acordo com a matriz experimental do planejamento fatorial $2^4$ .....                          | 62 |
| 1.3  | Visualização da banda correspondente ao gene de activina em gel de poliacrilamida a 40% corado com nitrato de prata.....  | 66 |
| 1.4  | Gráfico Pareto para os efeitos dos fatores padronizados sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo completo. ....                                | 69 |
| 1.5  | Análise de resíduos para os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct– modelo completo.....  | 70 |
| 1.6  | Gráfico Pareto para os efeitos dos fatores padronizados sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo final .....                                   | 72 |
| 1.7  | Análise de resíduos para os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo final. ....   | 72 |
| 1.8  | Avaliação do efeito principal dos fatores A, B, C e D sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct .....  | 73 |
| 1.9  | Avaliação do efeito da interação entre os fatores intensidade de vácuo (B) e concentração de lípidos (C) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct. .... | 74 |
| 1.10 | Avaliação do efeito da interação entre os fatores intensidade de (B) e concentração de pAct (D) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.....           | 75 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.11 Avaliação do efeito da interação entre os fatores velocidade de rotação (A) e intensidade do vácuo (B) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.....  | 76  |
| 1.12 Avaliação do efeito da interação entre a velocidade de rotação (A) e a concentração de lípidos (C) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct.....  | 77  |
| 1.13 Representação gráfica da interação entre os fatores A (velocidade de rotação – rpm), B (intensidade do vácuo – mbar) e C (concentração de lípidos – mM) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct.....   | 78  |
| 1.14 Representação gráfica da interação dos fatores A (velocidade de rotação – rpm), B (intensidade do vácuo – mbar) e D (concentração de pAct - µg/mL) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct .....   | 79  |
| 1.15 Resultados do potencial zeta e do diâmetro médio dos LpAct para os diferentes tratamentos realizados no planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....  | 80  |
| 2.1 Representação esquemática das moléculas do DOPE organizadas na fase hexagonal (HII) e na fase lamelar (L) segundo TURNER e GRUNER, 1992 .....  | 87  |
| 2.2 Processo para o preparo das amostras de LBr e LpAct utilizadas nas análises por EDXD .....   | 92  |
| 2.3 Esquema ilustrativo da montagem utilizada na difração de raios X dispersiva em energia na linha XRF do LNLS .....  | 93  |
| 2.4 Espectro EDXD dos LBr preparados em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7.4 (A) e pH 5.0 (B).....  | 96  |
| 2.5 Espectro EDXD dos LBr preparados em meio de cultura pH 7.4 (A) e pH 5.0 (B) .....  | 97  |
| 2.6 Espectro EDXD dos LpAct preparados em tampão Tris NaCl 50 mM pH 7,4 (A) e pH 5,0 (B).....  | 100 |
| 2.7 Espectro EDXD dos LpAct preparados em meio de cultura completo contendo 10% de SFB a pH 7,4 (seta A) e pH 5,0 (seta B) .....   | 102 |
| 3.1 Efeito citotóxico dos LpAct nas concentrações de pAct iguais a 6,5, 3,2, 1,3 e 0,65 µg/mL em MCC. As determinações foram realizadas após o período de incubação de 4, 24 e 48 horas. O crescimento celular foi determinado por intermédio do teste MTT. Os resultados expressam a média de 8 amostras..... | 120 |

**3.2 Fotomicrografias da expressão de EGFP em células LNCaP. As células foram transfectadas com LpEGFP em meio RPMI com 10% SFB (A) e com 5% SFB (B) ou com o reagente Lipofectamina™ 2000 associado ao pEGFP em meio opt-MEM® I (C). Nas imagens A, B e C as células foram examinadas por microscopia de fluorescência e em D por microscopia de contraste de fase. A amplificação de todas as fotomicrografias foi igual a 20x..... 126**

## LISTA DE TABELAS

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 1.1 | Matriz experimental correspondente ao planejamento fatorial completo $2^4$ com quatro fatores e dois níveis de cada fator .....  | 55  |
| 1.2 | Resumo das etapas 1 e 2 da produção dos LpAct em relação aos fatores A e B .....   | 60  |
| 1.3 | Resultados do teor de encapsulação (%) de pAct nos LpAct .....   | 67  |
| 1.4 | Modelo fatorial completo para o teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct .....                                       | 68  |
| 1.5 | Modelo fatorial final para o teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct.....   | 71  |
| 3.1 | Planejamento dos Experimentos A e B para avaliação da expressão de EGFP a partir da incubação dos LpEGFP nas células LNCaP. .... | 115 |
| 3.2 | Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP transfectadas com os LpEGFP .....                                      | 121 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| A/O                                | Água/óleo   |
| AO                                 | Ácido oléico  |
| ATCC                               | <i>American type culture collection</i>   |
| Am- $\beta$ -CD <sup>+</sup> /pAct | Complexo ciclodextrina catiônica/plasmídeo pAct   |
| Am- $\beta$ -CD <sup>+</sup>       | 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina  |
| $\beta$ -CDPs                      | Polímeros catiônicos baseados em $\beta$ -ciclodextrinas                                  |
| CD <sup>+</sup>                    | Ciclodextrina   |
| CDs                                | Ciclodextrinas  |
| CHEMS                              | Hemisuccinato de colesterol   |
| CHO                                | Células de ovário de hamster chinês.  |
| CHOL                               | Colesterol  |
| DC                                 | 3 $\beta$ -(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil   |
| DC-CHOL                            | 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol.                              |
| DDAB                               | Dimetiloctadecilamônio  |
| DMSO                               | Dimetilsulfóxido  |
| DOPC                               | Dioleilfosfatidilcolina   |
| DOPE                               | Dioleilfosfatidiletanolamina  |
| DOTAP                              | 1,2-dioleiltrimetilamôniopropano  |
| DOTMA                              | Cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio.                             |
| EDXD                               | Difração de raios X dispersiva em energia   |
| EGFP                               | <i>Enhanced green fluorescent protein</i>   |
| GFP                                | Proteína verde fluorescente   |
| LB                                 | Meio de cultura <i>Luria Broth</i>  |
| LBr                                | Lipossomas brancos (sem DNA)  |
| LNCaP                              | Linhagem de células humanas de carcinoma de próstata.                                     |
| LNLS                               | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron  |
| LpAct:                             | Lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD <sup>+</sup> /pAct  |
| LpEGFP                             | Lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD <sup>+</sup> /pEGFP |
| MC                                 | Meio de cultura = RPMI 1640   |
| MCC                                | Meio de cultura completo = RPMI 1640 + 10% SFB  |

|          |  |
|----------|--|
| MTT      | Reagente 3-[[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de Difeniltetrazolio} |
| pAct     | Plamídeo contendo o gene que codifica a proteína activa                |
| PBS      | Tampão fosfato-salina ( <i>phosphate buffered saline</i> ).            |
| PC3      | Células de câncer de próstata humano                                   |
| PCG      | Reagente PicoGreen®  |
| pEGFP-N1 | Plasmídeo contendo o gene capaz de expressar a proteína GFP            |
| PE       | Fosfatidiletanolamina  |
| PEI      | Polietilenimina  |
| PLL      | Poli-L-lisina  |
| POPC     | Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina                                       |
| PVC      | Porcentagem de viabilidade celular                                     |
| REV      | Evaporação por fase reversa  |
| SFB      | Soro fetal bovino  |
| TE       | Tampão composto de Tris (500 mM) e EDTA (50 mM)                        |
| TGF-β    | Fatores β de crescimento e de transformação                            |
| Tris     | Tampão composto por tris(hidroximetil)aminometano e cloreto de sódio   |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>2.1 Terapia gênica</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>2.2 Vetores virais e não virais</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>2.3 Sistema de liberação polimérico</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>2.4 Sistema de liberação lipossomal</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>2.5 Lipossomas pH-sensíveis</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>2.6 Ciclodextrinas</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>2.7 Activinas</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | <b>45</b> |
| <b>3.1 Objetivos específicos</b> .....   | <b>46</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO 1 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS TECNOLÓGICAS E DE FORMULAÇÃO SOBRE O TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DO PLASMÍDEO pAct EM LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS USANDO EXPERIMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup></b> ..... | <b>47</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>2.1 Material</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>2.2 Planejamento experimental</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>2.3 Análise estatística</b> .....   | <b>56</b> |
| <b>2.4 Obtenção do plasmídeo pAct</b> .....  | <b>56</b> |
| <b><u>2.4.1 Amplificação do pAct</u></b> .....   | <b>56</b> |
| <b><u>2.4.2 Separação, purificação e identificação do pAct</u></b> .....   | <b>57</b> |
| <b><u>2.4.3 Preparação do complexo Am-β-CD<sup>+</sup>/pAct</u></b> .....  | <b>58</b> |
| <b>2.5 Preparação de LpAct</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>2.6 Determinação do diâmetro médio dos LpAct</b> .....  | <b>61</b> |
| <b>2.7 Determinação do potencial zeta dos LpAct</b> .....  | <b>61</b> |
| <b>2.8 Determinação do teor de encapsulação de pAct nos LpAct</b> .....  | <b>61</b> |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>3.1 Identificação do gene da activina no plasmídeo pAct</b> .....   | <b>66</b> |
| <b>3.2 Análise fatorial do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct</b> .....  | <b>66</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3 Diâmetro médio e potencial zeta dos lipossomas LpAct .....   | 80         |
| 4 CONCLUSÕES .....   | 81         |
| <br>   |            |
| <b>CAPÍTULO 2 ESTUDO DO EFEITO DO pH E DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA SOBRE A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR DOS LIPOSSOMAS LpAct UTILIZANDO DIFRAÇÃO DE RAIOS X DISPERSIVA EM ENERGIA (EDXD).....</b> | <b>84</b>  |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 85         |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 90         |
| 2.1 Material .....   | 91         |
| 2.2 Preparação dos lipossomas .....  | 91         |
| 2.3 Preparação dos <i>pellets</i> dos LBr e LpAct .....  | 92         |
| 2.4 Realização das medidas de EDXD.....  | 92         |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 94         |
| 3.1 Análise por EDXD da organização supramolecular do DOPE nas amostras de LBr.....  | 95         |
| <u>3.1.1 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LBr preparados em tampão Tris pH 7,4 e 5,0.....</u>  | <u>95</u>  |
| <u>3.1.2 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LBr preparados em meio de cultura pH 7,4 e 5,0.....</u>  | <u>96</u>  |
| 3.2 Análise por EDXD da organização supramolecular do DOPE nas amostras de LpAct.....  | 98         |
| <u>3.2.1 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LpAct preparados em tampão Tris pH 7,4 e 5,0.....</u>  | <u>98</u>  |
| <u>3.2.2 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LpAct preparados em meio de cultura completo a pH 7,4 e 5,0.....</u>   | <u>101</u> |
| 4 CONCLUSÕES .....   | 103        |
| <br>   |            |
| <b>CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA CAPACIDADE DE TRANSFEÇÃO DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO CICLODEXTRINA CATIONICA/DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS LNCaP .....</b>               | <b>105</b> |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 106        |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 108        |
| 2.1 Material .....   | 109        |
| 2.2 Cultivo das células LNCaP.....   | 110        |
| <u>2.2.1 Descongelamento das células.....</u>  | <u>110</u> |

|  |            |
|--|------------|
| <b><u>2.2.2 Subcultivo das células</u></b> .....                           | <b>110</b> |
| <b><u>2.2.3 Congelamento das células</u></b> .....                         | <b>111</b> |
| <b>2.3 Avaliação da citotoxicidade dos LpAct</b> .....                     | <b>112</b> |
| <b>2.4 Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP</b> ..... | <b>113</b> |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                      | <b>118</b> |
| <b>3.1 Avaliação da citotoxicidade dos LpAct</b> .....                     | <b>119</b> |
| <b>3.2 Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP</b> ..... | <b>121</b> |
| <b>4 CONCLUSÕES</b> .....  | <b>127</b> |
| <br>   |            |
| <b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....   | <b>130</b> |
| <br>   |            |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>132</b> |
| <br>   |            |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                    | <b>134</b> |

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

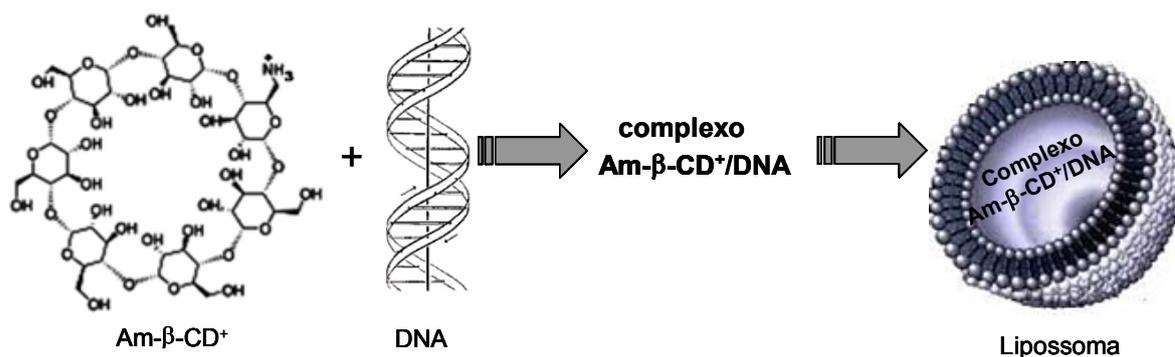
Nos países em desenvolvimento, o câncer se tornou a primeira causa de morte e, nos países industrializados, está prestes a ocupar esta mesma posição. Devido à sua natureza invasiva assim como o seu complexo mecanismo de desenvolvimento, os tratamentos clássicos, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são ainda, em muitos casos, ineficientes (MORILLE *et al.*, 2008). Desta forma, novas estratégias de tratamento têm sido pesquisadas levando em consideração os avanços tecnológicos conquistados recentemente. Segundo Morille e colaboradores (2008), o uso da terapia gênica no tratamento do câncer constitui uma ferramenta promissora para a erradicação desta doença, pois permite tratá-la na sua origem. Os autores consideram que a expressão relativamente pequena, de uma proteína terapêutica ativa, pode ser suficiente para erradicar um tumor, diferentemente das doenças genéticas, tais como a fibrose cística, para a qual o tratamento demandaria uma expressão de longa duração. Pelo menos quatro estratégias importantes podem ser utilizadas no âmbito da terapia gênica: (i) desativar a expressão do oncogene, (ii) promover a expressão de genes supressores do tumor, para induzir a apoptose das células cancerígenas, (iii) inibir a neoangiogênese, (iv) estimular o sistema imune contra as células tumorais.

Entre 1989 e 2010, o câncer ocupou o primeiro lugar nos ensaios clínicos da terapia gênica, ou seja, 64,6% de todos os ensaios clínicos realizados foram direcionados ao tratamento desta doença (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Das estratégias mais utilizadas nestes ensaios estão incluídas a utilização da expressão de genes supressores de tumor, a imunoterapia e a expressão de genes codificando enzimas (genes suicidas) capazes de converter pró-fármacos em drogas citotóxicas (EDELSTEIN e colaboradores, 2007).

Apesar da terapia gênica propor estratégias interessantes para o tratamento do câncer, a sua aplicação clínica depende da superação de alguns obstáculos, dentre eles, conseguir realizar a liberação de moléculas de ácidos nucléicos diretamente em tecidos específicos. Para isto é necessário o desenvolvimento de vetores capazes de protegerem estas moléculas da degradação, enquanto liberam o gene de interesse em tecidos e compartimentos sub-celulares específicos (LIU e HUANG,

2002). Assim, vários carreadores de origem viral e não viral têm sido investigados, no sentido de permitir o sucesso desta abordagem terapêutica. Os vetores virais e os vetores não virais catiônicos têm sido os sistemas mais estudados e utilizados nos ensaios clínicos da terapia gênica, porém, ainda são falhos com relação à eficácia e segurança terapêutica.

Nesse contexto, a proposta desta tese de doutorado foi desenvolver e caracterizar um carreador lipossomal aniônico para o transporte de um plasmídeo contendo o gene da proteína activina (pAct), em função do seu potencial em inibir o crescimento celular e a progressão do câncer de próstata. Para a obtenção deste sistema lipossomal, o pAct foi previamente complexado com moléculas de amino- $\beta$ -ciclodextrina catiônica ( $\text{Am-}\beta\text{-CD}^+$ ), e em seguida, encapsulado em lipossomas aniônicos pH-sensíveis (LpAct), como ilustrado na **Figura 1**.



**Figura 1** - Esquema do processo de obtenção dos LpAct

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Terapia gênica

A terapia gênica é um método para o tratamento ou a prevenção de doenças que emprega genes capazes de promover ou inibir a produção de proteínas. Sabe-se que a ausência ou a super produção de determinadas proteínas pode conduzir a uma variedade de manifestações clínicas, dependendo do papel estrutural ou funcional que elas desempenham no organismo, e que a administração de proteínas exógenas tem várias limitações como forma de tratamento. As proteínas são moléculas de alta massa molar, o que dificulta a sua passagem através das membranas plasmáticas, a maioria possui baixa biodisponibilidade, reduzida estabilidade em meios biológicos e demandam um alto custo de produção. Assim, a possibilidade de administrar ao paciente um gene como uma “pro-droga” é uma estratégia que pode ser usada, tanto para a produção celular de uma proteína difícil de ser administrada de forma exógena, quanto para a inibição daquela que está sendo produzida de forma anormal pelo organismo (MAHATO e TOMLINSON, 2001). Para Ledley (1996), a terapia gênica tem um potencial promissor para o tratamento seguro e eficiente de uma variedade de doenças humanas, dentre elas as de origem hereditária, as desordens neurodegenerativas, as infecções por vírus e o câncer.

Atualmente, com o crescimento da engenharia genética e das técnicas de clonagem, tem sido cada vez mais fácil a identificação de genes responsáveis por características normais e patológicas, bem como, o isolamento e a reprodução destes genes em bactérias hospedeiras. Desta forma, a facilidade na obtenção de genes terapêuticos tem motivado a pesquisa na área da terapia gênica, apesar dos vários desafios ainda a serem vencidos.

Na terapia gênica, a sequência de um gene codificando uma proteína terapêutica de interesse é comumente integrada em moléculas de DNA denominadas plasmídeos (YEW, 2005). Os plasmídeos são elementos extracromossomais com capacidade de

replicação autônoma, constituído por uma molécula de DNA de fita dupla circular, que podem ser adicionados de genes com as suas respectivas sequências reguladoras. Em nível molecular, as moléculas de DNA plasmidial podem ser consideradas “pró-drogas” que, após serem internalizadas nas células, utilizam a sua maquinaria de transcrição e de tradução para a biossíntese da entidade terapêutica, a proteína (PATIL *et al.*, 2005). Nos ensaios clínicos com a terapia gênica, entre os anos de 1989 a 2010, o uso de moléculas de DNA ou de DNA plasmidial correspondeu a 18,7% do total dos vetores utilizados (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Vale ressaltar, que o uso da injeção direta de DNA livre no local do tumor é uma técnica simples, capaz de produzir altos níveis de expressão do gene e tem sido usada em vários protocolos experimentais. No entanto, este tipo de tratamento é restrito aos locais que podem ser facilmente acessados, tais como a pele e os músculos. Por outro lado, o emprego de DNA livre para liberação sistêmica é pouco efetivo, devido à presença das nucleases no soro e à baixa captação celular destas moléculas (MORILLE *et al.*, 2008).

De acordo com a natureza do material a ser administrado no paciente, a terapia gênica compreende três abordagens diferentes de tratamento: (i) a baseada em células - denominada *ex-vivo* - na qual algumas células do paciente são retiradas e transfectadas *ex vivo*, com um gene codificando um produto terapêutico. Em seguida, estas células são administradas ao paciente via transplante ou transfusão; (ii) a baseada em vírus – que consiste na administração ao paciente de vírus geneticamente modificado e carreando genes terapêuticos; (iii) a baseada em plasmídeos - que consiste na administração ao paciente de DNA livre purificado ou de formulações farmacêuticas contendo moléculas de DNA (LEDLEY, 1996).

Hillery (2001) descreve a terapia gênica como um processo composto das seguintes etapas básicas: (i) o empacotamento do material genético em um vetor capaz de conduzir o ácido nucléico até a célula alvo; (ii) a entrada do material genético, freqüentemente ainda associado ao seu vetor, no citoplasma da célula alvo; (iii) a transferência do ácido nucléico para o núcleo da célula, seguido ou não da incorporação do DNA no genoma celular; (iv) a expressão do gene e a síntese da proteína de interesse. Neste contexto, um dos principais desafios da terapia gênica é o desenvolvimento de carreadores de genes eficientes e atóxicos, que possam

---

liberar efetivamente o material genético em tipos específicos de células, incluindo as células cancerígenas (GARCÍA, 2007). Na literatura, podem ser divididos em dois grandes grupos, os sistemas descritos como capazes de transferir material genético para o interior celular e expressar genes de interesse *in vitro* e/ou *in vivo*, a saber: vetores virais e vetores não virais.

## 2.2. Vetores virais e não virais

Os vetores virais mais comuns utilizados na terapia gênica são os derivados dos adenovírus, retrovírus, vírus adeno-associados e o vírus da herpes simples. Para a obtenção dos vetores, os vírus sofrem modificações para eliminação de sua patogenicidade e inserção no genoma do gene de interesse. Como os vírus possuem uma habilidade natural de penetrarem nas células de mamíferos e de assumirem o controle da expressão gênica, os vetores virais são portadores de grande capacidade de transfecção, apesar dos sérios problemas relacionados com a sua segurança terapêutica, tais como, a possibilidade de reversão do vírus à sua forma patogênica e a sua integração ao genoma celular (SRINIVASAN e BURGESS, 2009).

Liu e Huang (2002) e Patil e colaboradores (2005) relatam que os vetores virais possuem atividade mutagênica e carcinogênica e que sua administração repetida induz resposta imune capaz de anular a expressão transgênica. Além disto, o alto grau de toxicidade destes vetores tem preocupado as autoridades sanitárias quanto ao risco de infecção do pessoal envolvido, tanto na pesquisa e na produção em larga escala dos vetores, quanto dos responsáveis pela condução dos ensaios clínicos, dos voluntários e de seus descendentes (MAHATO e TOMLISON, 2001; TENENBAUM *et al.*, 2003).

Raper e colaboradores (2003) relatam o resultado de um ensaio clínico destinado a avaliar a segurança de um vetor adenovírus expressando o transgene humano OTC (ornitina transcarbamilase). Durante o ensaio ocorreu a morte de um voluntário por

---

resposta inflamatória sistêmica, suscitando ainda mais a preocupação com a segurança dos vetores virais. Os autores ressaltam que os estudos realizados em modelos animais são limitados para prever sobre a segurança do uso destes vetores em humanos; chamam a atenção para a alta variabilidade da resposta entre indivíduos e alertam para a necessidade de mais estudos sobre a resposta imunológica.

Outros relatos descrevendo as limitações de uso dos vetores virais incluem: resposta inflamatória local, disseminação do vírus no organismo (TIMME *et al.*, 1998), dificuldades com o *scale up* (McTAGGART e AL-RUBEAI, 2002) e a perda de potência das preparações durante transporte e armazenagem (NYBERG-HOFFMAN e AGUILAR-CORDOVA, 1999).

O primeiro ensaio clínico com a terapia gênica foi realizado em 1989 por Rosemberg e colaboradores (ROSEMBERG *et al.*, 1990). Deste ano até 2010, mais de 1714 ensaios clínicos foram concluídos ou estão em andamento em mais de 28 países, sendo que o vetor viral foi utilizado em cerca de 70% dos casos (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Em 2003, foi aprovado pela agência reguladora da China (*Chinese State Food and Drug Administration*) o primeiro produto comercial para a terapia gênica desenvolvido pela SiBiono GeneTech Co. O medicamento Gendicine, lançado em 2004, utiliza um vetor de adenovirus para carrear o gene p53 para o tratamento do câncer escamoso de cabeça e pescoço. O uso do Gendicine proporcionou completa regressão dos tumores em, aproximadamente, dois terços dos voluntários em estágio final da doença (PATIL *et al.*, 2005; EDELSTEIN *et al.*, 2007).

Apesar dos vetores virais ainda serem os sistemas carreadores mais estudados *in vitro* e *in vivo*, a utilização destes sistemas como agentes de transfecção tem sido continuamente reavaliada pelos pesquisadores e pelas agências reguladoras em saúde, em função dos problemas e efeitos adversos que são capazes de produzir. Desta forma, a busca por carreadores eficientes e com baixa toxicidade tem sido cada vez mais pronunciada no grupo dos vetores não virais.

Os vetores não virais têm sido desenvolvidos para facilitar a transferência de genes exógenos em células alvo, sem os efeitos adversos causados pelos vetores virais. As vantagens destes sistemas em relação aos virais são: menor toxicidade, ausência de imunogenicidade, menor custo de produção e possibilidade de repetição de doses. Além disso, permitem a adição de ligantes para o direcionamento de liberação sítio-específica, e o tamanho da molécula de DNA a ser encapsulada no sistema não é um fator limitante (ANWER *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2007). A principal desvantagem destes carreadores é a baixa eficiência de transfecção, principalmente, para aplicações *in vivo* (ILARDUYA *et al.*, 2010). De acordo com o material empregado para a produção dos vetores não virais, os sistemas mais utilizados para a liberação de DNA podem ser classificados em dois grandes grupos: (i) sistemas de liberação polimérico, no qual o DNA é complexado com polímeros, (ii) sistemas de liberação lipossomal, no qual o DNA pode ser encapsulado ou complexado com lipossomas (PATIL *et al.*, 2005).

### **2.3 Sistema de liberação polimérico**

Os sistemas de liberação poliméricos compreendem o uso de polímeros catiônicos que se ligam às moléculas de DNA formando complexos denominados poliplex. Estes complexos podem interagir com a membrana celular, que é negativamente carregada, promovendo assim, a rápida internalização do DNA (PATIL *et al.*, 2005).

Sistemas poliméricos contendo moléculas de DNA podem ser constituídos por proteínas naturais, como as histonas, polipeptídeos sintéticos, polietilenimina (PEI), dendrímeros catiônicos, 2-dimetilaminoetilmetacrilato (pDMAEM), ou polímeros baseados em carboidratos, como a quitosana.

O desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação de DNA é fundamentado por vários atrativos, tais como: os polímeros catiônicos podem ser sintetizados com diferentes comprimentos, com diferentes geometrias (linear ou ramificada) e são passíveis de sofrerem substituição ou adição de grupos funcionais, com relativa facilidade e flexibilidade, o que permite o planejamento de liberação direcionada do

material genético. Os polímeros catiônicos são solúveis em água, e não possuem a capacidade de fundir ou de desestabilizar o endossoma por intermédio de interações direta com a membrana endossomal. Desta forma, a primeira geração sintetizada de polímeros catiônicos, tais como a polilisina ou poliarginina, foram pouco efetivos quanto à capacidade de escapar do endossoma e, conseqüentemente, de promover um bom nível de transfecção. A síntese de uma segunda geração de polímeros catiônicos, dentre eles a PEI e os dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) trouxe nova perspectiva para o uso destes vetores. Estes polímeros possuem a capacidade de promover o rompimento do endossoma pelo mecanismo denominado “esponja de prótons”. A hipótese que explica este mecanismo é a seguinte: em pH fisiológico apenas 1 a 6 átomos de nitrogênio destas moléculas são protonadas. No endossoma, com a redução do pH, a proporção de nitrogênios protonados aumenta, gerando um gradiente de carga que induz o influxo de íons cloreto. O aumento da concentração de íons cloreto conduz à entrada de água no endossoma, promovendo assim, o seu intumescimento e ruptura (ILARDUYA *et al.*, 2010).

Entre os polímeros catiônicos, o PEI é considerado um dos mais efetivos agentes de transfecção e foi usado pela primeira vez em 1995 (BOUSSIF *et al.*, 1995; GODBEY e MIKOS, 2001; AL-DOSARI e GAO, 2009). A condensação de moléculas de DNA ou RNA com PEI em complexos estáveis é baseada em interações eletrostáticas. A complexação conduz a uma redução significativa do volume de DNA, cerca de  $10^4$  a  $10^6$  vezes, em relação ao volume do DNA livre. A eficiência de transfecção e a toxicidade dos PEI dependem do peso molecular, da configuração e da relação de carga polímero/DNA. Vários estudos mostram que os PEI de alto peso molecular (maior do que 25.000 Da) são tóxicos para as células enquanto polímeros com médio ou baixo peso molecular (5.000 a 25.000 Da) são mais eficientes e menos tóxicos (FISCHER *et al.*, 1999). O aumento da quantidade de polímero no complexo, ou seja, da relação polímero/DNA de 2 para 20 resulta na diminuição do tamanho da partícula, de >1000 nm para 100 a 200 nm, e no índice de polidispersão (ILARDUYA *et al.*, 2010). Além disto, o grau de ramificação do polímero influencia a sua complexação com as moléculas de DNA. PEIs altamente ramificados formam poliplex pequenos, portadores de grande capacidade de transfecção, porém exibindo alto grau de toxicidade.

---

Apesar da capacidade dos polímeros catiônicos em condensar as moléculas de DNA, formando complexos de tamanho pequeno, a alta afinidade destes polímeros com as moléculas de DNA pode dificultar a separação do DNA do polímero, no interior do citoplasma ou do núcleo, limitando o nível de transfecção do sistema. O políplex baseado em poli-L-lisina (PLL) com baixo peso molecular possui maior poder de dissociação e maior capacidade de transfecção do que o seu análogo com alto peso molecular (ILARDUYA *et al.*, 2010).

Os polímeros catiônicos são passíveis de sofrer alterações estruturais durante o armazenamento. Foi observado que, após um tempo de armazenamento de três semanas, os políplex produzidos a partir de derivados de PEI, altamente ramificados e flexíveis, tiveram a sua capacidade de transfecção aumentada em cerca de oito vezes, provavelmente devido a fortes interações eletrostáticas responsáveis pela formação de um políplex mais compacto (ILARDUYA *et al.*, 2010).

Embora na terapia contra o câncer, novos polímeros passaram do estágio de caracterização *in vitro* para o da validação pré-clínica, a eficiência de transfecção da maioria destes sistemas é considerada significativamente menor do que a dos vetores virais (ANWER *et al.*, 2003). Segundo Lehtinen e colaboradores (2008), nos experimentos *in vitro*, os polímeros catiônicos têm sido eficientes agentes de transfecção, porém falham na condição *in vivo*, devido a interações extracelulares com as proteínas polianiónicas e os polissacarídeos (glicosaminoglicanos). Como a presença destes polianions é abundante no meio extracelular, estas interações podem interferir na transferência de genes tanto no nível sistêmico como local. Para Sakaguchi e colaboradores (2008), apesar de serem vistos como promissores carreadores, a eficiência destes vetores ainda é baixa e precisa ser melhorada. Desta forma, ainda é um desafio a produção de uma nova geração de polímeros portadores de melhor biocompatibilidade, estabilidade biológica, especificidade celular, tráfego intracelular e menor toxicidade.

## 2.4 Sistema de liberação lipossomal

Segundo Patil e colaboradores (2005), os lipossomas constituem uma das ferramentas mais versáteis para a liberação de moléculas de DNA com propriedades terapêuticas. Estes carreadores possuem características importantes que fundamentam esta afirmativa, tais como, o tamanho coloidal das vesículas, a biocompatibilidade e a capacidade de serem introduzidas modificações químicas na sua superfície. Além de não produzirem resposta imunológica, estes sistemas podem melhorar a estabilidade biológica do material genético, que pode ser encapsulado no interior das vesículas ou nas camadas lipídicas.

No grupo dos sistemas de liberação lipossomal, os lipossomas catiônicos são considerados um dos vetores não virais mais promissores no âmbito da terapia gênica (LI *et al.*, 2010). Desde a sua primeira utilização em 1987 por Felgner e colaboradores, vários lípides catiônicos têm sido sintetizados e utilizados na liberação de genes em cultura de células, animais e pacientes inscritos nas fases I e II de ensaios clínicos (WASUNGU e HOEKSTRA, 2006; IGARASHI *et al.*, 2006). Nos ensaios clínicos realizados até 2010, eles representaram cerca de 6,4% dos vetores utilizados (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide). Dentre os agentes de transfecção sintéticos disponíveis comercialmente, mais da metade deles são baseados em reagentes catiônicos (ILARDUYA *et al.*, 2010). A natureza não imunogênica, a facilidade e o baixo custo de produção industrial dos lipossomas catiônicos, em relação aos vetores virais, são fatores que motivam a pesquisa destes carreadores. Vários estudos têm demonstrado o uso destes sistemas para a liberação de diferentes plasmídeos contendo genes de interesse (MERDAN *et al.*, 2002; PATIL *et al.*, 2005).

Em geral, os lipossomas catiônicos são constituídos de uma mistura de lípides catiônicos sintéticos com lípides neutros, denominados auxiliares. Os lípides catiônicos funcionam como agentes complexantes e de condensação das moléculas de DNA, levando à formação de um complexo lipossomal catiônico denominado lipoplex. Os lípides catiônicos são moléculas anfifílicas, constituídas de um grupo polar catiônico (normalmente grupo amino), um domínio hidrofóbico (constituído de

cadeia alquílica ou colesterol) e um ligante conectando o grupo polar ao não polar. Complexos com carga residual negativa, positiva ou neutra podem ser obtidos dependendo da razão de cargas entre os lípidos catiônicos e as moléculas de DNA (ILARDUYA *et al.*, 2010). Tem sido amplamente demonstrado, que preparações de lipoplex com alto excesso de carga positiva possuem uma elevada capacidade de transfecção (DÜZGÜNES e FELGNER, 1993). A carga positiva destes vetores permite interações eletrostáticas com a membrana celular negativamente carregada, facilitando a sua captação pelo mecanismo de fusão e/ou via endocitose. Por outro lado, quando o complexo tem uma carga neutra, há tendência de formação de agregados, com menor eficiência de transfecção.

A mistura de moléculas de DNA com moléculas de lípidos catiônicos conduz à formação dos complexos lípido/DNA que se organizam, espontaneamente, em diferentes estruturas supramoleculares, dentre elas a fase lamelar ou hexagonal invertida. A fase lamelar corresponde a uma estrutura globular condensada, consistindo em uma monocamada de moléculas de DNA, as quais mantêm um espaçamento interhelical uniforme, acomodada entre duas bicamadas lipídicas catiônicas. A estrutura hexagonal invertida é formada por moléculas de DNA revestidas por uma monocamada de lípidos catiônicos, arranjados em uma rede bidimensional hexagonal (MORILLE *et al.*, 2008). A estrutura supramolecular dos lipoplex tem influência sobre o potencial de transfecção destes sistemas e a sua formação depende de vários fatores, dentre eles, a estrutura química dos lípidos catiônicos, a carga residual do complexo, a inclusão de lípidos auxiliares e o modo de preparo (DA CRUZ *et al.*, 2001). A associação de polímeros com os lipoplex para a formação de complexos híbridos tem sido uma estratégia investigada para promover a fusão do sistema lipossomal com o endossoma e facilitar a transferência do gene para o citosol (GAO e HUANG, 1996; SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Da mesma forma, a inclusão de lípidos auxiliares com propriedades fusogênicas, tal como a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), tem um papel importante no mecanismo de escape endossomal e, conseqüentemente, na atividade de transfecção (FARHOOD *et al.*, 1995).

Apesar do apreciável sucesso na transferência de genes, a citotoxicidade dos lipossomas catiônicos tem sido relatada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*.

Lappalainen e colaboradores (1994) demonstraram a citotoxicidade de lipossomas catiônicos constituídos por brometo de dimetiloctadecilamônio (DDAB)/DOPE em linhagem celular de carcinoma cervical humano – CaSki. Para Felgner e colaboradores (1994) o mecanismo da citotoxicidade dos lípides catiônicos está relacionado às alterações na carga das membranas celulares e à efeitos adversos sobre a atividade dos canais iônicos, dos receptores e das enzimas celulares. Dokka e colaboradores (2000) avaliaram em camundongos a toxicidade dos lipossomas catiônicos com as seguintes carga residual e composição: neutros (palmitoil-oleil-fosfatidilcolina - POPC), negativos (POPC/dioleilfosfatidilglicerol), positivos (monocatiônico - DOTAP ou policatiônico - dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxiamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanoamino/DOPE). Os lipossomas com carga residual negativa ou neutra não apresentaram toxicidade pulmonar. Entretanto, a instilação pulmonar de lipossomas catiônicos produziu inflamação de forma dose-dependente. E ainda, os efeitos tóxicos foram mais pronunciados para os lipossomas policatiônicos do que para os lipossomas monocatiônicos, constituído de DOTAP. Zhu e colaboradores (1993), relataram uma expressão *in vivo* relativamente baixa da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) após injeção do DNA plasmidial CMV-CAT previamente complexado com lipossomas compostos de cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA)/DOPE. Para Patil e colaboradores (2005), a reduzida eficiência de transfecção *in vivo* dos lipossomas catiônicos está relacionada com fatores, tais como, a facilidade na qual os lipoplex se ligam com as proteínas do soro e a heterogeneidade e instabilidade dos complexos. A distribuição heterogênea do tamanho das vesículas lipossomais nas preparações torna difícil o controle de qualidade, o *scale-up* e reduz a estabilidade de prateleira do produto farmacêutico, prejudicando assim, o seu uso na rotina de tratamento. Segundo Ilarduya e colaboradores (2010), o uso do colesterol na composição dos lipossomas catiônicos melhora a estabilidade destes sistemas no soro e a sua aplicação *in vivo*. O uso sistêmico de uma formulação de lipossomas catiônicos composta de DOTAP/colesterol (CHOL), carreando um plasmídeo contendo um gene supressor de tumor p53, obteve uma resposta positiva para o tratamento de câncer primário e disseminado de pulmão em ratos (RAMESH *et al.*, 2001).

Segundo Morille e colaboradores (2008), o tratamento para as várias formas do câncer deve ser feito de forma sistêmica e direcionado para as células cancerosas. Neste sentido, o alcance do tumor via corrente sanguínea é o grande desafio. Para isto, os sistemas de liberação têm que permanecer na corrente sanguínea, sem serem degradados ou capturados pelos mecanismos de defesa do organismo. Uma vez no local do tumor, eles precisam extravasar para o tecido e se ligar especificamente nas células alvo. Neste aspecto, os autores afirmam que administração sistêmica dos lipossomas catiônicos ainda é um obstáculo devido às limitações destes carreadores, tais como: baixa estabilidade, alta toxicidade, capacidade de formarem agregados e a tendência de serem capturados pelo sistema fagocitário mononuclear. Vários estudos de biodistribuição demonstram o acúmulo destes carreadores no pulmão, fígado e baço. Este acúmulo pode ser explicado pelo fato de que estes sistemas requerem alta concentração dos complexos por dose terapêutica. Estas partículas positivamente carregadas rapidamente formam agregados, que possuem menor poder de transfecção e capacidade de desencadear efeitos tóxicos. Desta forma, para Sakaguchi e colaboradores (2008), embora os lipossomas catiônicos sejam considerados promissores vetores não virais, eles devem ser aprimorados para alcançarem uma liberação sistêmica efetiva. Assim, continua sendo um desafio o desenvolvimento de um carreador de genes estável, com baixa toxicidade, capaz de encapsular e de liberar o material genético exógeno em tipos específicos de células, tais como as cancerígenas, e com a eficiência de transfecção dos vetores virais.

A fim de contornar os inconvenientes advindos da utilização dos lipossomas catiônicos, estudos empregando lipossomas aniônicos como carreadores de moléculas de DNA têm sido realizados (FIILLION *et al.*, 2001; MOZAFARI *et al.*, 2002; PATIL *et al.*, 2004).

Fillion e colaboradores (2001) avaliaram em células de *E. coli* um sistema lipossomal aniônico composto de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), na razão molar de 10:1, contendo o plasmídeo pUC18. Estes lipossomas foram preparados na presença de solução de sais monovalentes (NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub> ou tampão fosfato) utilizando-se o método de desidratação-reidratação de vesículas. O teor de encapsulação do plasmídeo nesses lipossomas foi de 48,3%,

independente do sal utilizado. Além disto, foi constatado que a maioria das moléculas de DNA encontrava-se internalizada nos lipossomas multilamelares.

De maneira semelhante, PatiL e colaboradores (2004) propuseram nova formulação de lipossomas aniônicos baseada na obtenção de um complexo ternário. O sistema obtido era composto por 1,2-dioleilfosfatidilglicerol (DOPG)/ DOPE (razão molar igual a 17/83, respectivamente), pelo plasmídeo pCMV-GFP, responsável pela expressão da proteína verde fluorescente, e por íons  $Ca^{+2}$ . Os resultados dos ensaios de transfecção, utilizando células de ovário de hamster - CHO, demonstraram que o complexo ternário é capaz de produzir altos níveis de transfecção, com boa reprodutibilidade. No entanto, o plasmídeo pCMV-GFP em sua forma livre apresentou nível de transfecção negligenciável. E ainda, a formulação desenvolvida neste estudo mostrou-se comparável ao lipossoma catiônico comercial LipofectAmina™, no que diz respeito à eficiência de transfecção e reprodutibilidade.

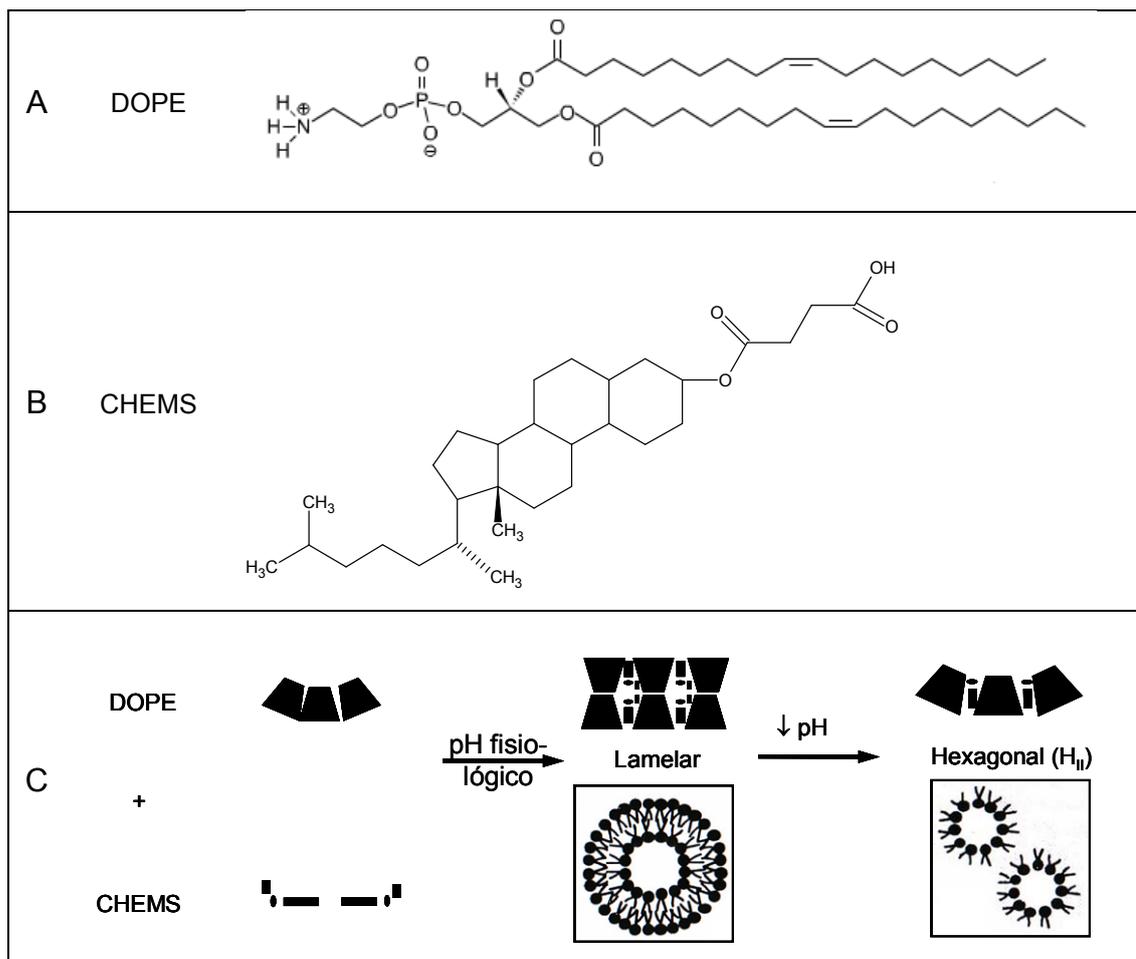
Uma estratégia diferente para complexar lipossomas aniônicos com a molécula de DNA é apresentada por Mady e colaboradores (2004). Neste trabalho os autores preparam lipossomas aniônicos contendo DNA plasmidial empregando como estratégia a condensação prévia das moléculas de DNA com moléculas de PEI. Os lipossomas aniônicos foram constituídos por dilauoilfosfatidiletanolamina (DLPE), dioleoilfosfatidilserina (DOPS) e CHOL. A eficiência de transfecção deste sistema lipossomal foi avaliada empregando-se células de hepatócitos humanos - HuH-7. Os experimentos de transfecção foram conduzidos com sucesso em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), indicando que este sistema carreador de DNA não foi inibido pelas proteínas do soro. Os autores consideraram os resultados promissores para a continuidade dos estudos e a utilização destes vetores no tratamento de doenças tais como a hepatite e o câncer.

## **2.5 Lipossomas pH-sensíveis**

Atualmente, existe um interesse especial no desenvolvimento de sistemas cujo mecanismo de liberação podem ser mediados por estímulos físicos e químicos, tais

como, temperatura, luz e pH. Neste sentido, os lipossomas pH-sensíveis constituem uma classe especial dentro do sistema de liberação lipossomal. Estes carreadores são constituídos de lípides que formam bicamada estável em pH fisiológico, porém em pH ácido, como ocorre no interior dos endossomas, nos tecidos tumorais e infeccionados, sofrem transição de fase, que conduz à desestabilização da bicamada e, conseqüentemente, o favorecimento da liberação do material encapsulado (FATTAL *et al.*, 2004). Este tipo de resposta ao estímulo de pH pode ser considerado um fator importante para potencializar a capacidade de transfecção dos lipossomas.

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a DOPE (**Figura 2A**). As moléculas de DOPE se organizam em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal invertida ( $H_{II}$ ), não sendo capazes de se apresentarem na forma de bicamadas (SIEGEL, 1986). Diferentemente da maioria dos fosfolípides, a DOPE possui uma cabeça polar pequena e pouco hidratada que ocupa um pequeno volume, quando comparado com o das respectivas cadeias de hidrocarbonetos, resultando numa geometria molecular do tipo cone. Este formato favorece o estabelecimento de fortes interações intermoleculares entre os grupos amino e fosfato da sua cabeça polar, o que explica a tendência destas moléculas a adquirirem a forma hexagonal invertida. A formação das vesículas lipossomais com este fosfolípide requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila - CHEMS (**Figura 2B**), que em pH fisiológico se encontra sob a forma ionizada (negativamente carregado). Como esquematizado na **Figura 2C**, a intercalação das moléculas de CHEMS com as moléculas de DOPE favorece a repulsão eletrostática entre os seus grupamentos carboxilados e fosfatos da cabeça polar, permitindo a formação de bicamadas. Enquanto que em pH fisiológico os lipossomas podem ser gerados de forma estável, em meio ácido ocorre a protonação dos grupos carboxílicos das moléculas de CHEMS causando o retorno das moléculas da DOPE para a fase hexagonal invertida (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998).



**Figura 2** – Estrutura química das moléculas de DOPE (A) e CHEMS (B) e esquema da formação das fases lamelar e hexagonal da DOPE (C).

Segundo Simões e colaboradores (2004), ainda não está esclarecido o mecanismo molecular que explica como os lipossomas superam a barreira da membrana endossomal para liberar o material encapsulado no citoplasma, evitando conseqüentemente, a fusão dos endossomas com os lisossomas. Três hipóteses têm sido propostas:

- a desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis causa o início da desestabilização da membrana endossomal, provavelmente pela formação de poros, que conduz à liberação do conteúdo encapsulado no citoplasma.
- após a desestabilização dos lipossomas, as moléculas encapsuladas se difundem pela membrana endossomal para o citoplasma.
- a fusão da membrana do lipossoma com a do endossoma leva à liberação do conteúdo lipossomal no citoplasma.

Em se tratando da utilização de lipossomas pH-sensíveis para mediar a liberação de ácidos nucleicos no interior celular, Legendre e Szoka (1992) demonstraram a capacidade destes sistemas em promover a transferência do DNA plasmidial pSV2 em células de fibroblastos de macaco - CV-1, na presença e ausência de SFB. A eficiência de transfecção dos lipossomas pH-sensíveis constituídos por DOPE:CHEMS, na razão molar de 2:1, foi comparada a dos lipossomas catiônicos constituídos por DOTMA:DOPE na razão molar 1:1. Os lipossomas catiônicos apresentaram maior eficiência de transfecção em meio isento de SFB. Na presença de SFB a eficiência de transfecção dos lipossomas catiônicos foi cerca de 5 vezes menor e a dos lipossomas pH-sensíveis de 1,5 menor, em relação aos respectivos resultados na ausência de SFB. Este dado confirma a maior influência da presença de proteínas no processo de transfecção com o emprego de lipossomas catiônicos. Os autores sugerem que a maior eficiência de transfecção demonstrada com os lipossomas catiônicos pode ser resultante de sua interação com a membrana nuclear, facilitando a captação do DNA plasmidial pelo núcleo, etapa importante do processo de transfecção.

Düzgünes e colaboradores (2001) relataram também que lipossomas pH-sensíveis compostos por DOPE:CHEMS foram mais eficientes na liberação de ácidos nucleicos em relação à lipossomas não pH-sensíveis constituídos de DOPE:fosfatidilglicerol (PG), DOPE:fosfatidilserina (PS) e DOPE:fosfatidilcolina (PC).

Considerando que a redução do volume da molécula de DNA é um requisito importante para a eficiência de transfecção mediada por lipossomas, Tavares e colaboradores (2006) desenvolveram e caracterizaram lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o DNA plasmidial pGEM-T, o qual foi previamente complexado com a 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (Am- $\beta$ -CD). Os lipossomas aniônicos pH-sensíveis constituídos de DOPE:CHEMS, na razão molar 6:4, apresentaram o teor de encapsulação de DNA igual a 28,0% (14  $\mu$ g/mL); diâmetro médio e potencial zeta iguais a 186,0 nm e -56 mV, respectivamente. Segundo os autores a estratégia de compactação prévia do DNA com um derivado da  $\beta$ -ciclodextrina catiônica favoreceu tanto o teor de encapsulação do DNA quanto a distribuição homogênea do tamanho e a estabilidade das vesículas.

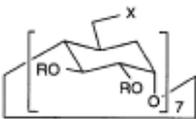
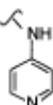
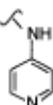
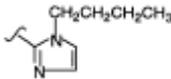
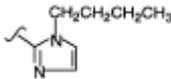
A propriedade de liberação pH-dependente de lipossomas contendo DOPE e CHEMS foi demonstrada por Cho e colaboradores (2008). Neste estudo, a liberação de calceína a partir das formulações de lipossomas constituídos por DOPE/CHEMS com razão molar 9/1, 8/2, 6/4 e 5/5 foi avaliada numa faixa de pH de 5 a 8. Nos resultados apresentados, os lipossomas DOPE/CHEMS (5/5) não tiveram uma liberação significativa na faixa de pH entre 6 a 8. Porém, em pH 5, uma quantidade apreciável de calceína foi liberada. Os lipossomas DOPE/CHEMS (6/4) e (8/2) tiveram um padrão de liberação semelhante à DOPE/CHEMS (5/5). Já os lipossomas compostos de DOPE/CHEMS (9/1), diferentemente dos anteriores, liberaram quase 90% da calceína em pH 6. De acordo com os resultados, é possível constatar a importância da proporção de CHEMS em relação à DOPE na estabilidade dos lipossomas compostos por estes lípidos frente à variação de pH. Quando a concentração de CHEMS é muito baixa, em pH 6, a concentração hidrogênica é suficiente para protonar os grupos carboxílicos das moléculas de CHEMS existentes, o que gera a desestabilização da bicamada e liberação do material encapsulado.

## 2.6 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formadas por 6 a 12 unidades de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, sendo as mais conhecidas a  $\alpha$  ciclodextrina (6 unidades),  $\beta$  ciclodextrina (7 unidades) e  $\gamma$  ciclodextrina (8 unidades). Elas possuem uma forma tronco-cônica com uma cavidade hidrofóbica, na qual podem ser incluídas uma grande variedade de moléculas-hóspedes de tamanho e forma adequados, resultando numa associação estável sem a formação de ligações covalentes. A face externa das ciclodextrinas é constituída pela hidroxilas ligadas ao C-2, C-3, C-6 que possibilitam tanto a solvatação por moléculas de água quanto a introdução de substituintes sem alterar a cavidade interna (FERNANDES e VEIGA, 1999). Os derivados de  $\beta$ -ciclodextrina catiônica contêm substituintes do tipo amônio, de forma que são capazes de interagirem com as moléculas de DNA por meio de ligações eletrostáticas, devido às cargas contrárias, como também por interações hidrofóbicas entre a sua cavidade hidrofóbica e as bases púricas e



grupamentos piridilamino, 1-n-butil-1H-imidazol, metoxietilamino e amino primário na posição C-6 de todas as unidades de glicose foram complexadas com o plasmídeo pCMV*luc* e avaliadas quanto à sua eficiência de transfecção (**Figura 4**). Os resultados encontrados para a eficiência de transfecção foram os seguintes: AM-1-CD > AP-1-CD > IM-2-CD > AP-2-CD > ME-1-CD > dimetil-β-ciclodextrina > IM-3-CD > β-CD. Em relação ao DNA livre, houve um aumento de até 4000 vezes na eficiência de transfecção com o uso desta série de derivados de β-ciclodextrina.

|  | Nome químico   | Sigla   | R                | X   |
|--|--|---------|------------------|---|
|  | β-ciclodextrina  | β-CD    | H                | OH  |
|  | heptakis-(6-desoxi-6-pirid-4-ilamino)-β-ciclodextrina                              | AP-1-CD | H                |    |
|  | heptakis-(2,3-di-O-acetil-6-desoxi-6-pirid-4-ilamino)-β-ciclodextrina              | AP-2-CD | Ac               |    |
|  | heptakis-[2,3-di-O-acetil-6-desoxi-6-(1-metil-1H-imidazol-2-il)]-β-ciclodextrina   | IM-1-CD | Ac               |   |
|  | heptakis-[6-(1-n-butil-1H-imidazol-2-il)-6-desoxi]-β-ciclodextrina                 | IM-2-CD | H                |  |
|  | heptakis-[2,3-di-O-acetil-6-(1-n-butil-1H-imidazol-2-il)-6-desoxi]-β-ciclodextrina | IM-3-CD | Ac               |  |
|  | heptakis-(6-desoxi-6-metoxietilamino)-β-ciclodextrina                              | ME-1-CD | H                | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>                                   |
| heptakis(6-amino-6-desoxi)-β-ciclodextrina   | AM-1-CD  | H       | -NH <sub>2</sub> |   |

**Figura 4** – Estrutura química de derivados aminados de ciclodextrinas utilizados por Cryan e colaboradores (2004).

Tavares e colaboradores (2006) analisaram em gel de agarose o grau de complexação entre as moléculas de Am-β-CD<sup>+</sup> com o plasmídeo pGEM-T. Foram avaliadas as seguintes razões de carga no complexo Am-β-CD<sup>+</sup>/DNA: 2<sup>+/</sup>; <sup>+/</sup>; <sup>+/2</sup>; <sup>+/4</sup>; <sup>+/8</sup>; <sup>+/16</sup>. O complexo com a razão de carga <sup>+/</sup> foi o que apresentou uma maior complexação das moléculas de DNA, revelada pela presença no gel de uma banda relativa ao DNA livre com menor intensidade em relação às outras amostras. Este complexo com razão de carga <sup>+/</sup> foi utilizado para preparar lipossomas compostos de DOPE:CHEMS (razão molar 6:4) com a concentração lipídica total de 20 mM. A quantidade de DNA encapsulada nesses lipossomas foi de aproximadamente 10 a 14 µg/mL.

## 2.7 Activinas

As activinas são proteínas que fazem parte da superfamília dos fatores  $\beta$  de crescimento e de transformação (TGF- $\beta$ ). Os membros desta superfamília de hormônios polipeptídicos controlam diversos processos celulares, dentre eles, a proliferação celular, apoptose, metabolismo, homeostase, diferenciação, resposta imune e função endócrina. Atualmente, sabe-se que as alterações estruturais ou a atividade desregulada destas proteínas no organismo estão associadas ao desenvolvimento de vários estados patológicos. Desta forma, existe um grande interesse no desenvolvimento de aplicações clínicas dos membros da TGF- $\beta$  como agentes terapêuticos no tratamento de várias doenças (HARRISON *et al.*, 2005).

As activinas foram originalmente purificadas a partir dos fluidos das gônadas e caracterizadas quanto à sua capacidade de estimular a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) a partir da glândula pituitária. As activinas são moléculas estruturalmente semelhantes aos demais membros da superfamília TGF- $\beta$  tendo em comum as subunidades  $\beta$  com cerca de 14 kDa. As subunidades  $\beta$  mais comuns são as subunidade  $\beta$ A e a subunidade  $\beta$ B. As activinas são homodímeros de subunidades  $\beta$  ligadas por pontes de hidrogênio. Dependendo da combinação destas subunidades, existem três diferentes isoformas de activina denominadas activina-A ( $\beta$ A $\beta$ A), activina-AB ( $\beta$ A $\beta$ B) e a activina-B ( $\beta$ B $\beta$ B), sendo a activina-A a mais abundante (BILEZIKJIAN *et al.*, 2004). As inibinas são as proteínas que atuam fundamentalmente como antagonistas das activinas, com quem compartilham grande homologia estrutural. As inibinas A e B são formadas por uma subunidade  $\alpha$ , comum a ambas, e uma subunidade  $\beta$ , que pode ser do tipo  $\beta$ A (presente na inibina A) ou  $\beta$ B (presente na inibina B). A subunidade protéica beta das inibinas é a mesma que se combina em homodímero para dar origem às activinas.

As activinas podem se expressar em vários tecidos humanos (em condições fisiológicas e patológicas) exercendo efeitos diferenciados incluindo o da inibição e da proliferação celular. A sua capacidade de estimular a proliferação celular tem sido mostrada em células de várias origens, dentre elas, os fibroblastos do fígado, queratinócitos, osteoblastos, e outras. Por outro lado, a sua habilidade em inibir o

crescimento celular tem sido demonstrada nas células do câncer de próstata, mama, células leucêmicas, endotélio vascular, musculatura vascular lisa, dentre outras. O mecanismo pelo qual as activinas inibem o crescimento celular ainda não está esclarecido, porém, é sugerido que envolve a regulação do crescimento e da diferenciação celular e a indução da apoptose, que inclui a ativação das caspases e das proteases responsáveis pela morte celular (CHEN *et al.*, 2002). Segundo Harrison e colaboradores (2005), as activinas têm a capacidade de inibir o crescimento de muitos tipos de células e de atuar como supressoras tumorais, nos estágios iniciais da tumorigênese. Muitas células tumorais escapam do efeito inibitório de crescimento das activinas pela ocorrência de mutações em seus receptores.

Vários estudos *in vitro*, utilizando células de câncer de próstata humana, têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial das activinas como um inibidor da carcinogênese e da progressão do câncer. A expressão das activinas A e B e de seus receptores foram identificadas nas células de câncer de próstata humano - PC3 (YING *et al.*, 1995) e LNCaP (BATRES *et al.*, 1995). Para Batres e colaboradores (1995), a expressão das activinas e de seus receptores nas células LNCaP sugere que estas proteínas podem ter uma função autócrina nestas células. Além disto, como as activinas atuam em muitos sistemas biológicos como modulador da proliferação e diferenciação celular, a proliferação das células LNCaP pode estar associada a um desequilíbrio entre a expressão das activinas e das inibinas.

Wang e colaboradores (1996) estudaram o efeito da exposição de células LNCaP às proteínas activina-A e à folistatina. Os resultados encontrados demonstraram que a activina-A é um potente inibidor da proliferação das células LNCaP, atuando tanto no mecanismo de inibição do crescimento celular quanto na indução de apoptose. O efeito inibitório da activina-A sobre o crescimento celular foi dependente da dose e do tempo de exposição e ocorreu de forma rápida e duradoura. No primeiro tempo de avaliação (após 12 h), a dose de 1nM de activina resultou em aproximadamente 50% de inibição da proliferação das células LNCaP. Experimentos confirmando a especificidade da folistatina em bloquear a ação da activina foram conduzidos com sucesso demonstrando que 2-4 nM de folistatina foram requeridos para bloquear completamente o efeito inibitório de 1nM de activina.

Dalkin e colaboradores (1996) avaliaram o efeito da activina-A sobre a taxa de proliferação celular das linhagens celulares LNCaP (andrógeno sensível) e PC3 (andrógeno resistente). As células foram tratadas com meio de cultura adicionado da proteína recombinante activina-A, em concentrações que variaram de 0,5 a 50 ng/mL, por um período de 24 e 48 horas. As células LNCaP tiveram o seu crescimento reduzido em 24 horas para as concentrações  $\geq 5$  ng/mL. A inibição do crescimento foi mais pronunciada após 48 horas, inclusive para a menor dose de 0,5 ng/mL. Já para as células PC3 nenhum efeito da activina sobre o crescimento celular foi observado, inclusive depois de 48 horas, sugerindo que os efeitos inibitórios da activina atuam apenas sobre as células tumorais andrógeno sensíveis.

Zhang e colaboradores (1997a) investigaram o papel da activina-A no crescimento, nas mudanças morfológicas e na expressão de marcadores de diferenciação prostáticos em células LNCaP. Neste experimento as células foram tratadas com várias quantidades da proteína recombinante activina-A. Os autores demonstram que a activina-A inibiu o crescimento celular de uma forma tempo e dose dependente. No grupo de células tratadas por cinco dias, foram observadas alteração da morfologia celular, as células se tornaram mais arredondadas, e o contato intercelular foi diminuído, em comparação ao grupo controle.

Ying e colaboradores (1997) avaliaram a participação da proteína supressora de tumor p53 no processo de inibição do crescimento celular das células LNCaP. Nas células tumorais tratadas com a proteína recombinante activina-A (20 ng/mL) foram observados a redução do crescimento e alteração da morfologia celular. A análise por *northern blot* revelou uma expressão aumentada da proteína p53, em comparação ao grupo controle. Os autores sugerem que a inibição do crescimento das células LNCaP pela activina-A pode ser, em parte, atribuída à expressão do gene p53.

Zhang e colaboradores (1997b) transfectaram células LNCaP com o plasmídeo pGEM-4z contendo o transgene da activina-A, utilizando o reagente de transfecção Lipofectamina™. Segundo os dados apresentados as células transfectadas foram capazes de expressar a proteína activina, que foi detectada por análise *western blot*. O efeito inibitório da activina sobre o crescimento celular foi confirmado por

experimentos conduzidos em paralelo, nos quais quantidades constantes de folistatina (inibidor específico da bioatividade da activina) foram adicionadas às culturas celulares. Nas culturas sem adição de folistatina a inibição do crescimento celular ocorreu de forma dose e tempo dependentes. Nas culturas com adição de folistatina houve crescimento celular, indicando a neutralização da ação da activina pela folistatina. O efeito da activina sobre a indução da apoptose celular foi demonstrada por mudanças na morfologia celular e análise do DNA genômico. Além disto, os autores demonstraram que a apoptose celular foi acompanhada de alteração na expressão dos genes *bcl-2* (diminuição) e *c-myc* (aumento).

## **OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos da presente tese de doutorado são preparar e caracterizar sob parâmetros físico-químicos e biológicos formulações de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo ciclodextrina catiônica/plasmídeo pAct (Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct).

#### 3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente tese de doutorado são:

- otimizar o preparo de lipossomas aniônicos pH-sensíveis compostos por DOPE:CHEMS contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct e caracterizá-los quanto ao diâmetro e potencial zeta;
- utilizar o planejamento fatorial 2<sup>4</sup> para verificar a influência da concentração de pAct e de lípidos, assim como, da velocidade de rotação e da intensidade do vácuo sobre o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct em lipossomas aniônicos pH-sensíveis, preparados pelo método de evaporação em fase reversa;
- avaliar a influência dos componentes do meio de cultura e da variação do pH sobre as transições de fase das moléculas de DOPE por intermédio da difração de raios X dispersiva em energia (EDXD);
- avaliar a atividade citotóxica de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct na linhagem de células LNCaP;
- avaliar a eficiência da transfecção de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pEGFP na linhagem de células LNCaP.

## **CAPÍTULO 1**

# **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS TECNOLÓGICAS E DE FORMULAÇÃO SOBRE O TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DO PLASMÍDEO pAct EM LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS USANDO EXPERIMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup>**

## **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho o experimento fatorial completo  $2^4$  foi utilizado para identificar os fatores que influenciam o processo de encapsulação do DNA nos lipossomas e determinar, de uma maneira racional, um protocolo de produção para os lipossomas aniônicos pH-sensíveis compostos de DOPE/CHEMS (razão molar igual a 6/4, respectivamente) contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct), pelo método de evaporação em fase reversa (REV).

O experimento fatorial  $2^k$  é um tipo de planejamento estatístico adequado para estudar, de forma eficiente e econômica, o efeito conjunto de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. Neste tipo de planejamento estão envolvidos  $k$  fatores, cada um deles presentes em dois níveis (WERKEMA, 1996).

Os fatores são variáveis independentes cujos valores (níveis do fator) são controlados pelo experimentador. Cada subdivisão de um fator é denominada de nível do fator e os tratamentos nos experimentos fatoriais consistem de todas as combinações possíveis entre os diversos fatores nos seus diferentes níveis. Para representar o valor maior do nível de um fator são utilizados os sinais (+) ou (1) e para o menor valor (-) ou (-1).

No experimento fatorial os fatores são variados simultaneamente, o que permite a observação dos efeitos dos fatores individuais sobre a variável resposta, assim como, a interação entre eles. Nos métodos em que as variáveis são analisadas isoladamente, o efeito das interações não pode ser determinado, o que torna mais difícil a otimização do processo.

O efeito principal de um fator pode ser definido como diferença entre as respostas médias observadas devido à mudança no nível do fator, isto é, a mudança do nível (-) para o nível (+).

---

Em um experimento fatorial o efeito de interação é observado quando a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é a mesma em todos os níveis dos outros fatores.

González-Rodríguez e colaboradores (2007) utilizaram um planejamento fatorial fracionado para investigar o efeito de cinco fatores, dois de formulação e três tecnológicos, no processo de revestimento de lipossomas contendo cloridrato de lidocaína com quitosana. Os fatores analisados foram: a concentração da solução de lidocaína, a concentração de solução de quitosana, a taxa de gotejamento da solução quitosana, a velocidade de agitação da dispersão coloidal e o tempo compreendido entre a produção dos lipossomas e o processo de revestimento. As respostas analisadas foram o teor de encapsulação da lidocaína e a eficiência de cobertura dos lipossomas com a quitosana. Os autores concluíram que o uso do experimento fatorial forneceu subsídios importantes para uma seleção racional dos fatores durante os estudos de formulação e permitiu uma rápida identificação e avaliação dos parâmetros mais importantes relacionados à estabilidade das vesículas. De acordo com os resultados, o maior teor de encapsulação da lidocaína foi observado no experimento em que o fator concentração da solução de lidocaína estava no nível alto e o fator concentração de quitosana no nível baixo. Com relação à eficiência de cobertura dos lipossomas, a melhor condição experimental foi aquela em que os fatores concentração da solução de quitosana e velocidade de agitação estavam no nível alto e a concentração da solução de lidocaína no nível baixo.

Neste trabalho foi utilizado um experimento fatorial  $2^4$  para estudar o efeito de quatro fatores sobre o percentual de encapsulação do plasmídeo pAct nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis. Os fatores foram intensidade do vácuo e velocidade de rotação, relacionados ao processo de produção dos lipossomas por REV, e as concentrações de lípidos e de plasmídeo pAct, relacionadas à formulação dos lipossomas.

O motivo principal para a escolha dos fatores intensidade de vácuo e velocidade de rotação teve sua origem durante o desenvolvimento do protocolo de produção dos LpAct. Além do valor destas variáveis ser estabelecido, geralmente, de forma empírica, durante a produção inicial dos LpAct, observamos que dependendo da

---

intensidade de vácuo utilizada na fase de evaporação do éter etílico, o aspecto da formação e quebra do gel era diferente e havia grande variabilidade no teor de DNA encapsulado. Na literatura não foram encontrados dados relacionando a capacidade de encapsulação dos lipossomas obtidos por REV com a intensidade do vácuo aplicado para evaporação do solvente orgânico. A recomendação de New (1990) é que a evaporação do solvente orgânico deve ser feita sob pressão reduzida de aproximadamente 600 mbar para que ocorra a aproximação das micelas inversas e formação do gel. Delattre e colaboradores (1993) sugerem que a evaporação seja feita em duas etapas: na primeira utilizando uma pressão reduzida de 260 a 520 mbar e na segunda com uma pressão de 930 mbar para a remoção dos traços do solvente orgânico.

Com relação aos fatores concentrações de lípidos e de plasmídeo pAct, a intenção de investigar o efeito dessas variáveis sobre a capacidade de encapsulação de DNA nos lipossomas pH-sensíveis foi baseada no trabalho anterior do grupo, realizado por Tavares e colaboradores (2006). Neste estudo, para os lipossomas compostos de DOPE/CHEMS (razão molar igual a 6/4, respectivamente) com concentração lipídica total de 20 mM, o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/DNA foi em torno de 50% da concentração de DNA empregada (25  $\mu$ g/mL). A partir destes dados, os fatores concentrações de lípidos e de plasmídeo pAct foram incluídos no experimento fatorial com o objetivo de determinar como estas variáveis contribuem para a obtenção de LpAct com o máximo de DNA encapsulado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

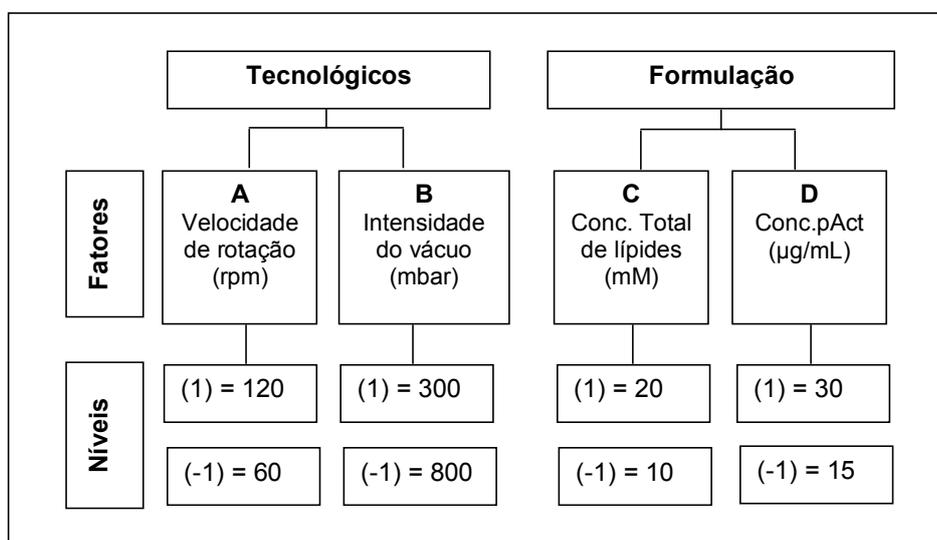
- DOPE – Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha).
- Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> - CycloLab Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Ltd (Budapeste, Hungria).
- Células *E. coli* DH5 $\alpha$  gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- CHEMS - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).
- Kit de purificação de DNA GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).
- Meio de cultura Luria Broth (LB) – Invitrogen (Barcelona, Espanha).
- Membranas de policarbonato HTPP – 0,4  $\mu$ m e GTTP – 0,2  $\mu$ m - Millipore (Billerica, MA, EUA).
- Plasmídeo pAct (5.797 pb) contendo o gene capaz de expressar a proteína activina (351 pb) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Quanti-iT™ PicoGreen® ds DNA Reagent and Kits – Invitrogen (Barcelona, Espanha).

Os demais reagentes usados foram de grau analítico.

### 2.2 Planejamento experimental

Na **Figura 1.1** está representado um esquema do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, contendo os fatores ou variáveis testadas, o valor dos níveis destes fatores e a simbologia

empregada neste estudo para representar o nível alto (1) e o nível baixo (-1) dos fatores.



**Figura 1.1 - Esquema do experimento fatorial  $2^4$  para estudo da influência dos fatores tecnológicos e de formulação sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct**

Para o fator velocidade de rotação (A) os valores avaliados foram: nível alto (1) 120 rpm e baixo (-1) 60 rpm. A intensidade de vácuo (B) os valores testados foram: nível alto (1) 300 mbar e baixo (-1) 800 mbar. Estes valores foram determinados com base na escala de operação do aparelho de rotavapor utilizado (100 a 900 mbar). Vale lembrar que a unidade do vácuo está expressa em valores de pressão, ou seja, quanto maior o valor do vácuo, menor o valor da pressão interna e vice-versa. Para o fator concentração de lípidos (C) os níveis estabelecidos foram: alto (1) 20 mM e baixo (-1) 10 mM. Para a concentração de pAct no complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct (D) os valores foram: nível alto (1) 30 µg/mL e baixo (-1) 15 µg/mL.

Neste estudo, o software estatístico Minitab 15 foi utilizado para gerar a matriz experimental. Nesta matriz (**Tabela 1.1**) estão descritos todos os tratamentos, ou seja, todas as possíveis combinações dos fatores A, B, C e D em seus dois níveis, bem como a ordem aleatória em que os experimentos foram realizados. No caso do planejamento fatorial  $2^4$  o número total de tratamentos foi igual a 16, sendo realizados em duplicata.

Em uma matriz experimental os tratamentos são designados por códigos que possuem o seguinte significado:

- (1) significa que todos os fatores estão no nível baixo;
- letra minúscula do fator indica que o fator está no nível alto;
- ausência da letra indica que o fator está no nível baixo.

Desta forma, um tratamento denominado *abcd* significa que todos os fatores estão no nível alto e *ad* que apenas os fatores A e D estão no nível alto e os fatores B e C estão no nível baixo.

**Tabela 1.1 - Matriz experimental correspondente ao planejamento fatorial completo  $2^4$  com quatro fatores e dois níveis de cada fator.**

| Ordem | Fator/nível |    |    |    | Código do tratamento |
|-------|-------------|----|----|----|----------------------|
|       | A           | B  | C  | D  |                      |
| 1     | -1          | -1 | 1  | 1  | <i>cd</i>            |
| 2     | -1          | -1 | 1  | -1 | <i>c</i>             |
| 3     | 1           | -1 | 1  | -1 | <i>ac</i>            |
| 4     | 1           | 1  | -1 | 1  | <i>abd</i>           |
| 5     | -1          | -1 | -1 | -1 | <i>(1)</i>           |
| 6     | -1          | -1 | -1 | 1  | <i>d</i>             |
| 7     | 1           | 1  | 1  | 1  | <i>abcd</i>          |
| 8     | -1          | 1  | 1  | 1  | <i>bcd</i>           |
| 9     | 1           | -1 | -1 | -1 | <i>a</i>             |
| 10    | 1           | 1  | 1  | -1 | <i>abc</i>           |
| 11    | 1           | -1 | 1  | -1 | <i>ac</i>            |
| 12    | -1          | 1  | -1 | 1  | <i>bd</i>            |
| 13    | 1           | 1  | 1  | -1 | <i>abc</i>           |
| 14    | -1          | 1  | -1 | -1 | <i>b</i>             |
| 15    | -1          | 1  | 1  | -1 | <i>bc</i>            |
| 16    | -1          | 1  | -1 | 1  | <i>bd</i>            |

| Ordem | Fator / nível |    |    |    | Código do tratamento |
|-------|---------------|----|----|----|----------------------|
|       | A             | B  | C  | D  |                      |
| 17    | -1            | 1  | 1  | -1 | <i>bc</i>            |
| 18    | -1            | 1  | -1 | -1 | <i>b</i>             |
| 19    | 1             | 1  | -1 | -1 | <i>ab</i>            |
| 20    | -1            | -1 | 1  | -1 | <i>c</i>             |
| 21    | 1             | -1 | -1 | -1 | <i>a</i>             |
| 22    | 1             | -1 | -1 | 1  | <i>ad</i>            |
| 23    | -1            | -1 | -1 | -1 | <i>(1)</i>           |
| 24    | 1             | 1  | -1 | -1 | <i>ab</i>            |
| 25    | 1             | -1 | 1  | 1  | <i>acd</i>           |
| 26    | -1            | -1 | 1  | 1  | <i>cd</i>            |
| 27    | 1             | -1 | 1  | 1  | <i>acd</i>           |
| 28    | 1             | -1 | -1 | 1  | <i>ad</i>            |
| 29    | -1            | 1  | 1  | 1  | <i>bcd</i>           |
| 30    | -1            | -1 | -1 | 1  | <i>d</i>             |
| 31    | 1             | 1  | 1  | 1  | <i>abcd</i>          |
| 32    | 1             | 1  | -1 | 1  | <i>abd</i>           |

## **2.3 Análise estatística**

O software estatístico Minitab 15 foi utilizado para análise dos efeitos principais e das interações entre os fatores velocidade de rotação, intensidade de vácuo, concentração de lípidos e concentração de DNA nos LpAct. Foram realizadas a análise de variância, para verificar a significância dos efeitos principais dos fatores e das interações, e a análise de resíduos, para validar as conclusões obtidas por meio da análise de variância.

O gráfico Pareto para os efeitos dos fatores padronizados foi utilizado com o objetivo de determinar os fatores e as interações que influenciam as respostas e de facilitar a comparação da significância de cada efeito. Neste gráfico, a linha divide os fatores estatisticamente significativos dos não significativos.

Foram utilizadas outras representações gráficas geradas pelo Minitab para demonstrar os efeitos principais dos fatores e os efeitos das interações que foram significativas.

## **2.4 Obtenção do plasmídeo pAct**

### **2.4.1 Amplificação do pAct**

O plasmídeo pAct foi amplificado utilizando-se células de *E. coli* DH5 $\alpha$  e a técnica de transformação bacteriana por choque térmico. Inicialmente, uma alíquota da solução de pAct contendo cerca de 1  $\mu$ g do plasmídeo foi misturada a 100  $\mu$ L da suspensão de *E. coli* DH5 $\alpha$ , e a preparação foi submetida ao seguinte processo de choque térmico: resfriamento em banho de gelo por 30 minutos, seguido de aquecimento por 30 segundos a 42 °C e, novamente, resfriamento em banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, 500  $\mu$ L de meio LB pH 7,4 foram adicionados à preparação que foi incubada em agitador térmico (Thermo Shaker Uniscience, TS-100 - Waltham, EUA)

por aproximadamente 2 horas, a uma temperatura de 37 °C e com agitação de 600 rpm. Após esta primeira etapa de crescimento, uma alíquota de 500 µL da cultura foi transferida para tubo de vidro contendo 10 mL de meio LB com antibiótico (100 µg de ampicilina para cada mL de meio de cultura). Esta preparação foi incubada em estufa (Forma Scientific - Waltham, EUA) regulada a 37 °C por cerca de 8 horas ou até o turvamento do meio. Finalmente, todo o volume de cultura foi transferido para uma garrafa de vidro de 500 mL contendo 80 mL de meio LB com antibiótico que foi incubada pernoite em banho-maria (Dubnoff, Tecnal TE-053 - Piracicaba, Brasil) regulado a 37 °C e com agitação de 300 rpm. As culturas de *E. coli* DH5α com massa celular adequada ( $OD_{600} > 2$ ) foram submetidas ao processo de separação e purificação do DNA plasmidial. O plasmídeo pAct foi construído a partir do plasmídeo pcDNA3 (5.446 pb) que contém o gene PvuI que confere resistência à ampicilina. Desta forma, as etapas de crescimento bacteriano em meio LB contendo ampicilina são consideradas seletivas para o crescimento das células de *E. coli* DH5α que foram transformadas com pAct.

#### **2.4.2 Separação, purificação e identificação do pAct**

A cultura de *E. coli* DH5α foi submetida à centrifugação (HITACHI, HIMAC CF7D2 - Tóquio, Japão) a 3000 rpm, por 20 min. a uma temperatura de 20 °C. A separação do plasmídeo pAct do *pellet* celular obtido e a sua purificação foram feitas por intermédio do kit Midiprep - GenElute™ HP, conforme protocolo do fabricante. A pureza do DNA plasmidial foi avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta (Espectrofotômetro UV-VIS, Hewlett Packard 8453 – Palo Alto, EUA) usando as seguintes razões de absorvâncias:  $(OD_{260} - OD_{320}) / (OD_{280} - OD_{320})$ . Segundo o fornecedor, razões obtidas entre 1,8 a 2,0 indicam que a preparação plasmidial tem uma pureza satisfatória. A concentração do pAct foi determinada pela leitura de absorvância a 260 nm, usando a seguinte relação:  $A_{260}$  igual a 1,0 = 50 µg/mL de DNA puro.

O plasmídeo pAct (5.797 pb) foi construído a partir da inserção do gene da activina (351 pb) no plasmídeo pcDNA3 (5.446 pb). A confirmação da presença do gene da

activina no DNA plasmidial amplificado foi feita por intermédio da eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% utilizando o padrão 1 Kb DNA plus. As amostras de pAct purificadas foram previamente digeridas com as enzimas de restrição Not I e EcoR I, capazes de cortar, de forma específica, o plasmídeo pcDNA3 nas regiões onde o gene da activina está inserido. Desta forma foi possível identificar no gel uma banda em torno de 351 pb indicando a presença do gene da activina no DNA plasmidial amplificado.

### **2.4.3 Preparação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct**

O complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foi preparado a partir da mistura de quantidades estequiométricas de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e de pAct de modo a se obter uma relação de carga igual a +/- . A concentração da solução de ciclodextrina utilizada foi de 0,18 mg/mL em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4.

Para a produção de 1,0 mL de lipossomas com pAct nas concentrações de 30  $\mu$ g/mL e de 15  $\mu$ g/mL as seguintes soluções do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foram preparadas:

- Solução A (30  $\mu$ g/mL): pipetou-se para um frasco de vidro uma alíquota da preparação plasmidial correspondente a 30  $\mu$ g de pAct, adicionou-se 0,6 mL da solução concentrada de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e um volume adequado do tampão Tris-NaCl para perfazer o volume total de 1,0 mL.
- Solução B (15  $\mu$ g/mL): pipetou-se para um frasco de vidro uma alíquota da preparação plasmidial correspondente a 15  $\mu$ g de pAct, adicionou-se 0,3 mL da solução concentrada de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e um volume adequado do tampão Tris-NaCl para perfazer o volume total de 1,0 mL.

A reação de complexação foi feita à temperatura ambiente, sob agitação magnética (Agitador Fanem - São Paulo, Brasil), durante 24 horas, para as duas soluções.

## 2.5 Preparação de LpAct

Os LpAct foram produzidos de acordo com a matriz experimental descrita na Tabela 1. Eles foram preparados nas concentrações lipídicas totais de 20 mM e de 10 mM. Para cada concentração lipídica as concentrações de pAct no complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foram iguais a 30  $\mu$ g/mL ou 15  $\mu$ g/mL.

O protocolo utilizado para a preparação de 1,0 mL de cada uma das formulações dos LpAct compreendeu as seguintes etapas:

1. Para a formação do filme lipídico, alíquotas de cada uma das soluções clorofórmicas dos fosfolípidos (DOPE 0,030 mmol/mL e CHEMS 0,020 mmol/mL) foram transferidas para um balão de fundo redondo de 50 mL e evaporadas por 30 minutos em rotavapor (Büchi Labortechnik AG - Postfach, Suíça) utilizando uma pressão de 150 mbar e uma rotação de 120 rpm. Em seguida, uma alíquota de NaOH 0,1M foi adicionada ao balão, com o objetivo de ionizar o CHEMS, e o filme foi imediatamente dissolvido com 3,0 mL de éter etílico, previamente tratado com solução tampão HEPES 10 mM, para eliminação de peróxidos. Posteriormente, um volume de 1,0 mL da solução do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4 foram adicionados ao balão. Finalmente, para a obtenção de uma emulsão do tipo A/O (água/óleo) a preparação foi misturada por cerca de 1 minuto utilizando-se vortex (Velp Scientifica - Milão, Itália).

As alíquotas dos fosfolípidos e de NaOH utilizadas para a obtenção dos lipossomas foram, respectivamente, as seguintes: 0,4 mL e 0,080 mL, para LpAct 20 mM, e 0,2 mL e 0,040 mL, para LpAct 10 mM. Para os lipossomas com pAct nas concentrações de 30 e de 15  $\mu$ g/mL foram empregadas as soluções A e B do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct, respectivamente.

2. Para a obtenção dos lipossomas, a emulsão A/O obtida na etapa 1 foi submetida a um processo de evaporação constituído de duas fases. A primeira fase, destinada à aproximação das micelas inversas presentes na emulsão e à

formação do gel, teve duração de 2 horas e os valores dos fatores velocidade de rotação (A) e intensidade do vácuo (B) foram ajustados de acordo com o especificado em cada um dos tratamentos da matriz experimental. Os valores utilizados foram de 60 ou 120 rpm para o Fator A e de 800 ou 300 mbar para o Fator B. A segunda fase, realizada para a completa eliminação do éter etílico e a obtenção dos lipossomas, teve duração de 1 hora. O valor do Fator A foi mantido igual ao utilizado na primeira fase, 60 ou 120 rpm e o valor do Fator B foi fixado em 100 mbar para todos os tratamentos. Na **Tabela 1.2** está apresentado um resumo das etapas 1 e 2 do processo de produção dos LpAct com os valores utilizados dos fatores A e B.

**Tabela 1.2 - Resumo das etapas 1 e 2 da produção dos LpAct em relação aos fatores A e B**

| <b>Etapas</b>                | <b>Tempo de duração</b> | <b>Intensidade do vácuo (Fator B) (mbar)</b> | <b>Rotação (Fator A) (rpm)</b> |
|------------------------------|-------------------------|--|--------------------------------|
| Preparação do filme lipídico | 30 minutos              | 150  | 120                            |
| Preparação de LpAct          | Etapa inicial: 2 horas  | 800 (-) ou 300 (+)                           | 60 (-) ou 120 (+)              |
|                              | Etapa final: 1 hora     | 100  | (+)                            |

3. Para a calibração das vesículas o método empregado foi a extrusão (extrusor Lipex Biomembranes - Vancouver, Canadá). Os lipossomas foram passados por membranas de policarbonato de 0,4  $\mu\text{m}$  (5 vezes) e de 0,2  $\mu\text{m}$  (5 vezes).
4. Para a purificação dos lipossomas (separação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct não encapsulado), o método utilizado foi a ultracentrifugação (Ultracentrífuga OPTIMA<sup>TM</sup> L-80 XP, Beckman Coulter - Fullerton, EUA). As amostras foram transferidas para tubos de polipropileno de 6,5 mL e submetidas à uma rotação de 150.000 x g por 90 min. à uma temperatura de 4 °C. O rotor utilizado foi de ângulo fixo. No final do processo, o sobrenadante foi pesado e um volume equivalente do tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4 foi adicionado ao tubo para ressuspensão dos lipossomas. A preparação foi agitada com uso de vórtex e os lipossomas foram armazenados sob refrigeração em atmosfera de nitrogênio.

## **2.6 Determinação do diâmetro médio dos LpAct**

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho dos LpAct foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um contador de partículas equipado com raio laser monocromático - Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments Ltd. - Westborough, Inglaterra).

As amostras das diferentes preparações dos LpAct foram diluídas em tampão Tris-NaCl 10 mM pH 7,4, previamente filtrado em membrana de 0,22  $\mu$ , de forma a obter um KCps entre 10 e 500. As medidas foram realizadas a 25 °C e no ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas e foram realizados em duplicata. A distribuição do diâmetro das vesículas (índice de polidispersão) foi avaliada utilizando o modo monomodal, o qual avalia a distribuição da população em torno de um diâmetro médio de partícula. Este índice varia de 0 a 1, indicando a obtenção de uma dispersão totalmente monodispersa e completamente polidispersa, respectivamente (LAVERMAN *et al.*, 1999).

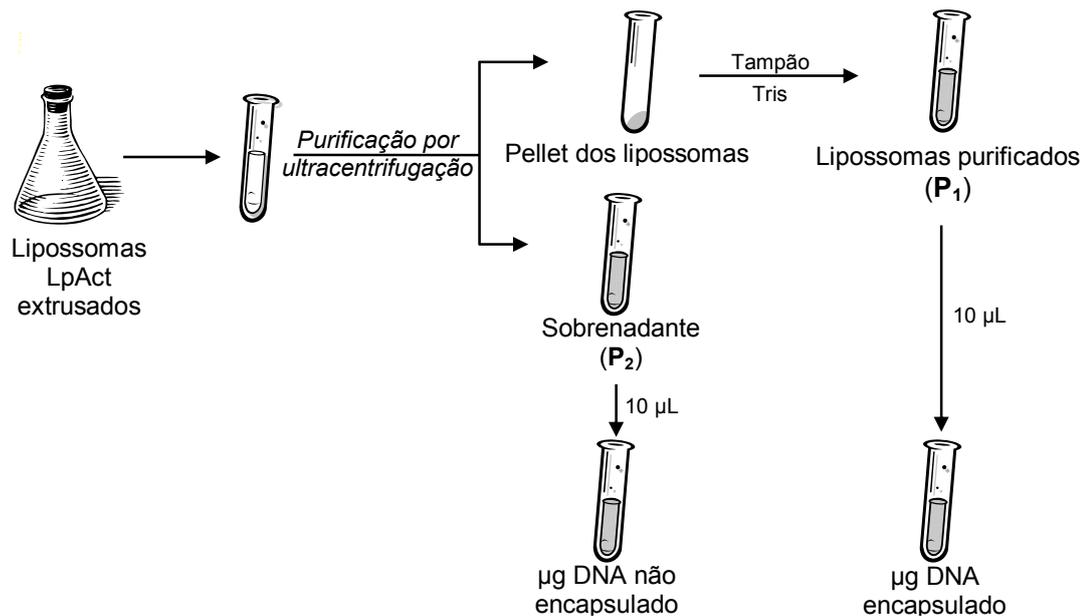
## **2.7 Determinação do potencial zeta dos LpAct**

O potencial zeta dos LpAct foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons associado à mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments Ltd. - Westborough, Inglaterra). As amostras foram diluídas em tampão Tris-NaCl 10 mM pH 7,4 e as medidas foram realizadas a 25 °C e no ângulo de 90°.

## **2.8 Determinação do teor de encapsulação de pAct nos LpAct**

O teor de encapsulação de pAct nos LpAct foi determinado a partir da dosagem de DNA nas amostras obtidas após a ultracentrifugação dos lipossomas previamente

extrusados. Conforme pode ser visto no esquema apresentado na **Figura 1.2**, na amostra do sobrenadante ( $P_2$ ) foi determinada a quantidade de pAct não encapsulada nos lipossomas. Na amostra de lipossomas purificados ( $P_1$ ), obtida após a ressuspensão do *pellet* em Tampão Tris 50 mM pH 7,4, foi determinada a quantidade de pAct encapsulada nos lipossomas.



**Figura 1.2** - Esquema para a determinação de pAct nas amostras dos LpAct preparados de acordo com a matriz experimental do planejamento fatorial  $2^4$ .

Para o cálculo do teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Teor de encapsulação} = \frac{\text{quantidade de pAct nos lipossomas purificados}}{\text{quantidade de pAct nos lipossomas purificados} + \text{quantidade de pAct no sobrenadante}} \times 100$$

A dosagem de pAct nos LpAct foi realizada por intermédio do kit Quanti-iT™ PicoGreen®. O reagente PicoGreen (PCG), que é capaz de se ligar às moléculas de DNA de dupla fita presente em solução, foi preparado em tampão TE pH 7,4, segundo o protocolo do fornecedor. A fluorescência das preparações foi medida em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC – Tóquio, Japão) nos comprimentos de

onda de excitação e de emissão de 480 e 520 nm, respectivamente. Em todas as amostras, o volume do reagente PCG utilizado foi de 1,0 mL e o volume final de reação foi de 2,0 mL. Após a adição do PCG, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz e as medidas de fluorescência realizadas após 2 minutos.

Para a determinação de pAct as amostras foram preparadas, em duplicata, da seguinte maneira: uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada preparação ( $P_1$  e  $P_2$ ) foi pipetada para frasco de polipropileno de 3,0 mL. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ L de álcool isopropílico, com o objetivo de romper a membrana lipossomal e promover liberação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct encapsulado nos lipossomas. Posteriormente, foi adicionado uma alíquota de 960  $\mu$ L de tampão TE, que teve o pH previamente ajustado para 10, para promover a dissociação da ciclodextrina do plasmídeo pAct e facilitar a reação do DNA com o reagente PCG. Os reagentes foram misturados utilizando vortex e, no momento da leitura, 1,0 mL do reagente PCG foi adicionado ao frasco.

Para a construção da curva de calibração, o DNA utilizado foi o plasmídeo pAct. Para isto foram preparadas duas soluções do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct: a estoque, na concentração de pAct de 0,01  $\mu$ g/ $\mu$ L em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4, e a diluída, na concentração de 0,002  $\mu$ g/ $\mu$ L em tampão TE pH 10. A solução estoque do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foi preparada conforme descrito no item 2.4.3. Uma alíquota da preparação plasmidial correspondente a 10  $\mu$ g de pAct foi pipetada para um tubo. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL da solução concentrada de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e um volume adequado do tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4 para perfazer o volume total de 1,0 mL.

As amostras para gerar a curva de calibração foram preparadas da seguinte maneira: alíquotas de 10, 50, 100, 150, 200  $\mu$ L da solução diluída do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foram pipetadas para os frascos de polipropileno. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ L de álcool isopropílico e diferentes alíquotas do tampão TE pH 10 para totalizar um volume final de 1,0 mL. Após a homogeneização dos reagentes, as amostras foram adicionadas de 1,0 mL do reagente PCG e as medidas de fluorescência foram realizadas como descrito anteriormente. A concentração final de pAct nas amostras da curva de calibração foram de 10, 50, 100, 150 e 200 ng/mL.

A amostra utilizada para zerar o aparelho (branco) foi preparada da seguinte forma: 30  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico adicionados de 970  $\mu\text{L}$  de tampão TE pH 10 e de 1,0 mL do reagente PCG.

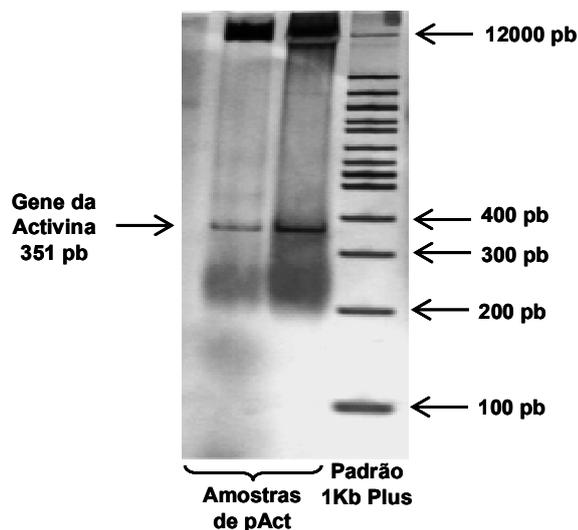
Durante a elaboração do protocolo para a dosagem de pAct nos lipossomas, o efeito da concentração de lípides sobre a fluorescência emitida foi previamente avaliado. Para isto foram preparadas amostras contendo 10, 20, 30  $\mu\text{L}$  de lipossomas brancos e uma amostra sem lipossomas. Em todas as amostras foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a reação foi desenvolvida de acordo com o protocolo descrito acima. Não houve diferença significativa entre a concentração de pAct determinada na amostra sem lípide e aquela adicionada de 10  $\mu\text{L}$  de lipossomas. Nas demais amostras houve uma diminuição crescente no valor da concentração de pAct.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação do gene da activina no plasmídeo pAct

Na **Figura 1.3** está apresentado o gel de poliácridamida das amostras do plasmídeo pAct após digestão com as enzimas de restrição Not I e EcoR I. A banda de 351 pb, correspondente ao gene da activina, pode ser visualizada nas canaletas das amostras de pAct entre as bandas de 300 e 400 pb do padrão de DNA 1 Kb Plus.



**Figura 1.3** - Visualização da banda correspondente ao gene de activina em gel de poliácridamida a 10% corado com nitrato de prata.

#### 3.2 Análise fatorial do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct

Na **Tabela 1.3** estão apresentados os tratamentos do experimento fatorial  $2^4$  com os respectivos resultados ( $n = 2$ ) encontrados para o teor de encapsulação (%) de pAct nos LpAct.

**Tabela 1.3 – Resultados do teor de encapsulação (%) de pAct nos LpAct**

| Tratamento | Código      | Teor de pAct encapsulado (%) | Tratamento | Código    | Teor de pAct encapsulado (%) |
|------------|-------------|------------------------------|------------|-----------|------------------------------|
| ++++       | <i>abcd</i> | 91,1                         | --+-       | <i>c</i>  | 42,6                         |
|            |             | 81,1                         |            |           | 45,6                         |
| -+++       | <i>bcd</i>  | 88,1                         | --++       | <i>cd</i> | 50,2                         |
|            |             | 86,5                         |            |           | 67,6                         |
| +--+       | <i>acd</i>  | 82,1                         | +--+       | <i>ad</i> | 80,7                         |
|            |             | 83,6                         |            |           | 89,6                         |
| ++-+       | <i>abd</i>  | 65,5                         | -+-+       | <i>bd</i> | 69,8                         |
|            |             | 73,2                         |            |           | 67,1                         |
| +++-       | <i>abc</i>  | 83,6                         | ---+       | <i>d</i>  | 71,3                         |
|            |             | 91,1                         |            |           | 81,0                         |
| ----       | <i>(1)</i>  | 63,4                         | ++--       | <i>ab</i> | 70,7                         |
|            |             | 60,7                         |            |           | 70,8                         |
| +---       | <i>a</i>    | 49,6                         | -++-       | <i>bc</i> | 79,8                         |
|            |             | 55,2                         |            |           | 81,0                         |
| -+--       | <i>b</i>    | 71,2                         | +-+-       | <i>ac</i> | 58,6                         |
|            |             | 68,7                         |            |           | 57,8                         |

Na **Tabela 1.4** estão apresentados os dados do modelo fatorial completo delineado a partir dos resultados do teor do plasmídeo pAct encapsulado nos LpAct. Na parte superior da tabela estão descritas as estimativas dos efeitos, a estatística *t* que testa a significância de cada um deles, e o valor P para cada efeito e interação. Na parte inferior está apresentado um resumo da análise de variância, pelo intermédio da qual o modelo é avaliado quanto à sua significância em explicar a variabilidade do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.

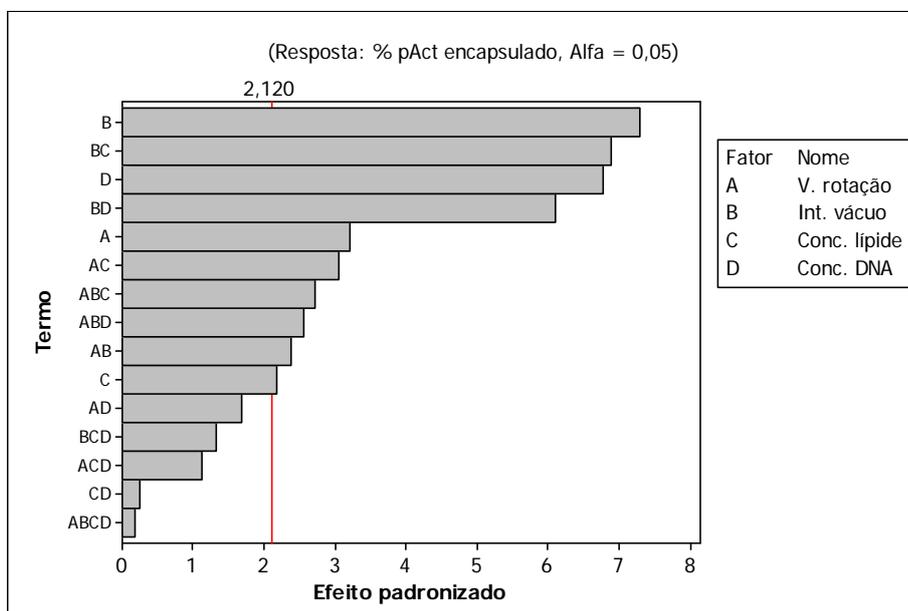
**Tabela 1.4 - Modelo fatorial completo para o teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct**

| Termo   | Efeito             | Coefficiente               | Desvio padrão do coeficiente | t                         | Valor P        |         |
|---|--------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------|---------|
| Constante   |                    | 71,061                     | 0,8389                       | 84,70                     | 0,000          |         |
| Velocidade rotação (Veloc.)   | 5,391              | 2,696                      | 0,8389                       | 3,21                      | 0,005          |         |
| Intensidade do vácuo (Int. vácuo)   | 12,236             | 6,118                      | 0,8389                       | 7,29                      | 0,000          |         |
| Conc. lipídica  | 3,662              | 1,831                      | 0,8389                       | 2,18                      | 0,044          |         |
| Conc. DNA   | 11,371             | 5,686                      | 0,8389                       | 6,78                      | 0,000          |         |
| Veloc.*Int. vácuo   | -3,986             | -1,993                     | 0,8389                       | -2,38                     | 0,030          |         |
| Veloc.*Conc. lipídica   | 5,107              | 2,554                      | 0,8389                       | 3,04                      | 0,008          |         |
| Veloc.*Conc. DNA  | 2,809              | 1,404                      | 0,8389                       | 1,67                      | 0,114          |         |
| Int. vácuo*Conc. lipídica   | 11,557             | 5,779                      | 0,8389                       | 6,89                      | 0,000          |         |
| Int. vácuo*Conc. DNA  | -                  | -5,117                     | 0,8389                       | -6,10                     | 0,000          |         |
| Conc. lipídica*Conc. DNA  | 0,428              | 0,214                      | 0,8389                       | 0,25                      | 0,802          |         |
| Veloc.*Int. vácuo*Conc. lipídica  | -4,550             | -2,275                     | 0,8389                       | -2,71                     | 0,015          |         |
| Veloc.*Int. vácuo*Conc. DNA   | -4,304             | -2,152                     | 0,8389                       | -2,56                     | 0,021          |         |
| Veloc.*Conc. lipídica*Conc. DNA   | -1,900             | -0,950                     | 0,8389                       | -1,13                     | 0,274          |         |
| Int. Vácuo*Conc. lipídica*Conc. DNA   | 2,237              | 1,119                      | 0,8389                       | 1,33                      | 0,201          |         |
| Veloc.*Int. vácuo*Conc. lipídica*Conc. DNA                                    | 0,282              | 0,141                      | 0,8389                       | 0,17                      | 0,868          |         |
| S = 4,74581   |                    | $R^2_{ajusta.} = 87,58\%$  |                              |                           |                |         |
| <b>Análise da variância para o teor de encapsulação (%) de pAct nos LpAct</b> |                    |                            |                              |                           |                |         |
| Fonte de variação   | Graus de liberdade | Soma Quadrática seqüencial | Soma Quadrática ajustada     | Média Quadrática ajustada | f <sub>0</sub> | Valor P |
| Efeitos principais  | 4                  | 2572,08                    | 2572,08                      | 643,021                   | 28,55          | 0,0     |
| Interações de segunda   | 6                  | 2306,83                    | 2306,83                      | 384,472                   | 17,07          | 0,0     |
| Interações de terceira ordem  | 4                  | 382,73                     | 382,73                       | 95,682                    | 4,25           | 0,0     |
| Interações de quarta ordem  | 1                  | 0,64                       | 0,64                         | 0,638                     | 0,03           | 0,8     |
| Erro residual   | 16                 | 360,36                     | 360,36                       | 22,523                    |                |         |
| Total   | 31                 | 5622,65                    |                              |                           |                |         |

Analisando a **Tabela 1.4**, é possível concluir, ao nível de significância de 0,05, que o efeito principal de todos os fatores, ou seja, da velocidade de rotação (A), da intensidade do vácuo (B), da concentração de lípidos (C) e da concentração de pAct (D) sobre o teor de encapsulação de pAct nos lipossomas foram significativos. Com relação à interação de dois níveis, foram significativas as interações entre os fatores: velocidade de rotação x intensidade do vácuo (AB); velocidade de rotação x concentração de lípidos (AC); intensidade do vácuo x concentração de lípidos (BC) e a intensidade do vácuo x concentração de DNA (BD). As interações de três níveis consideradas significativas foram entre os fatores: velocidade de rotação x

intensidade do vácuo x concentração de lípidos (ABC) e velocidade de rotação x intensidade do vácuo x concentração de pAct (ABD).

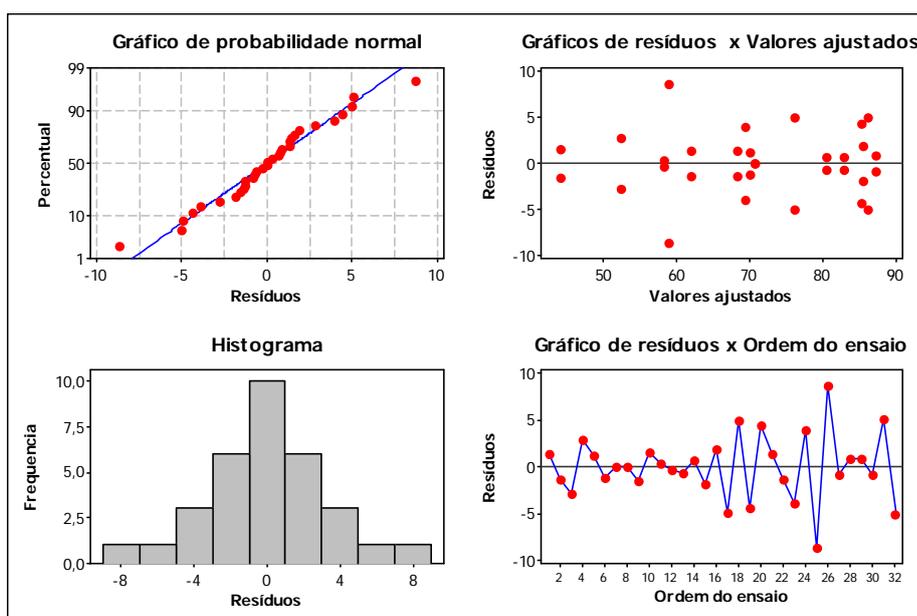
Na **Figura 1.4** está apresentado o Gráfico Pareto com os termos associados aos efeitos principais e às interações e suas possíveis significâncias sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct (a linha divide os efeitos significativos dos não significativos). Analisando esta figura, é possível constatar que a maior contribuição ao modelo ocorre, em primeiro lugar, por parte do fator intensidade do vácuo (B), e em segundo lugar, pela concentração de pAct (D). O fator concentração de lípidos (C) apresenta o efeito principal menos significativo, porém, participa juntamente com o fator intensidade do vácuo (B) da interação de dois níveis mais significativa (BC). A segunda interação de dois níveis mais significativa é entre os fatores intensidade do vácuo x concentração de pAct (BD). Com relação à interação de três níveis, podemos verificar que o grau de significância das interações ABC e ABD são semelhantes.



**Figura 1.4 - Gráfico Pareto para os efeitos dos fatores padronizados sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo completo.**

Na **Figura 1.5** estão apresentados os gráficos relativos à análise de resíduos, com o objetivo de validar os resultados obtidos por meio da análise de variância.

Analisando os gráficos, podemos constatar os seguintes pontos: (i) o erro experimental tem distribuição normal - no gráfico de probabilidade normal para os resíduos, os pontos estão localizados ao longo de uma linha reta e o histograma é simétrico; (ii) a variância do erro experimental é a mesma em todos os tratamentos - no gráfico de resíduos versus valores ajustados não há configurações especiais; (iii) os erros experimentais são independentes – no gráfico de resíduos *versus* a ordem de ensaio, os resíduos estão distribuídos de forma aleatória em torno do eixo horizontal. Desta forma, as conclusões obtidas por meio da análise de variância podem ser consideradas válidas, pois não há indícios de violação da suposição de que os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct são independentes, normalmente distribuídos e com a mesma variância em cada tratamento.



**Figura 1.5 - Análise de resíduos para os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct– modelo completo.**

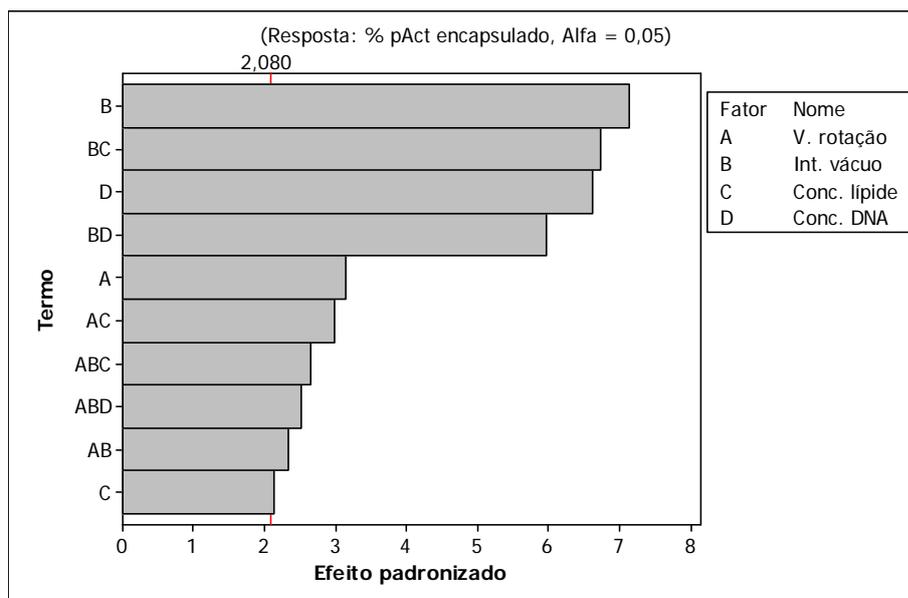
Na **Tabela 1.5** está apresentado o modelo final para a estimativa dos efeitos dos fatores sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct, no qual todos os efeitos das interações não significativas foram excluídos. Estas interações referem-se às de quatro níveis, envolvendo os fatores ABCD; as de três níveis entre os fatores intensidade de vácuo x concentração de lípidos x concentração de pAct

(BCD) e velocidade de rotação x concentração de lípidos x concentração de pAct (ACD) e as dois níveis entre os fatores velocidade de rotação x concentração de pAct (AD) e concentração de lípidos x concentração de pAct (CD).

**Tabela 1.5 - Modelo fatorial final para o teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct**

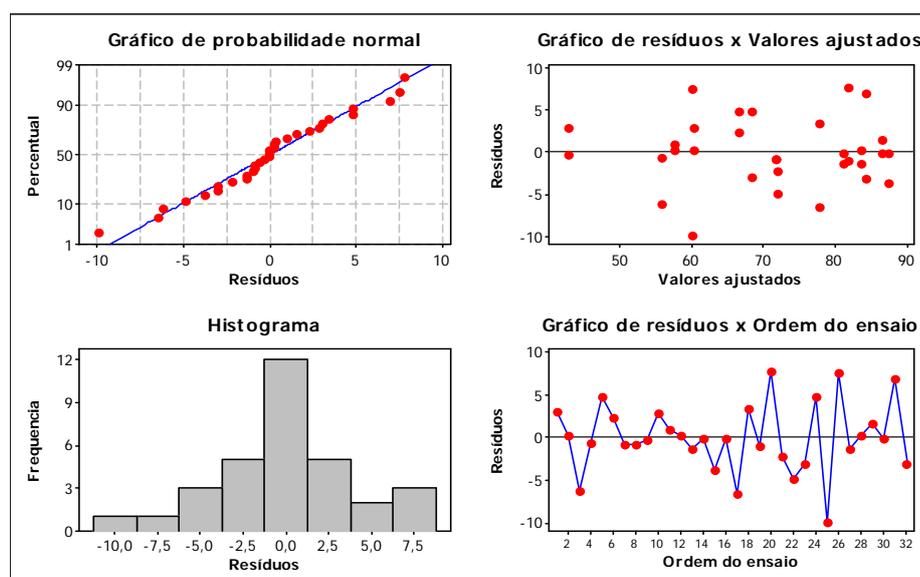
| Termo   | Efeito             | Coefficiente                    | Desvio padrão do coeficiente | t                         | Valor P        |         |
|---|--------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------|---------|
| Constante   |                    | 71,061                          | 0,8578                       | 82,84                     | 0,000          |         |
| Velocidade rotação (Veloc.)   | 5,391              | 2,696                           | 0,8578                       | 3,14                      | 0,005          |         |
| Intensidade do vácuo (Int.)   | 12,236             | 6,118                           | 0,8578                       | 7,13                      | 0,000          |         |
| Conc. lipídica  | 3,662              | 1,831                           | 0,8578                       | 2,13                      | 0,045          |         |
| Conc. DNA   | 11,371             | 5,686                           | 0,8578                       | 6,63                      | 0,000          |         |
| Veloc.*Int. vácuo   | -3,986             | -1,993                          | 0,8578                       | -2,32                     | 0,030          |         |
| Veloc.*Conc. lipídica   | 5,107              | 2,554                           | 0,8578                       | 2,98                      | 0,007          |         |
| Int. vácuo*Conc. lipídica   | 11,557             | 5,779                           | 0,8578                       | 6,74                      | 0,000          |         |
| Int. vácuo*Conc. DNA  | -10,234            | -5,117                          | 0,8578                       | -5,96                     | 0,000          |         |
| Veloc.*Int. vácuo*Conc. lipídica  | -4,550             | -2,275                          | 0,8578                       | -2,65                     | 0,015          |         |
| Veloc.*Int. vácuo*Conc. DNA   | -4,304             | -2,152                          | 0,8578                       | -2,51                     | 0,020          |         |
| S = 4,85263   |                    | $R^2_{\text{ajust.}} = 87,02\%$ |                              |                           |                |         |
| <b>Análise da variância para o teor de encapsulação (%) do plasmídeo pAct nos LpAct</b> |                    |                                 |                              |                           |                |         |
| Fonte de variação   | Graus de liberdade | Soma Quadrática seqüencial      | Soma Quadrática ajustada     | Média Quadrática ajustada | f <sub>0</sub> | Valor P |
| Efeitos principais  | 4                  | 2572,1                          | 2572,1                       | 643,02                    | 27,31          | 0,000   |
| Interações de segunda   | 4                  | 2242,3                          | 2242,3                       | 560,56                    | 23,81          | 0,000   |
| Interações de terceira  | 2                  | 313,8                           | 313,8                        | 156,90                    | 6,66           | 0,006   |
| Erro residual   | 21                 | 494,5                           | 494,5                        | 23,55                     |                |         |
| Total   | 31                 | 5622,6                          |                              |                           |                |         |

A partir da análise dos dados da **Tabela 1.5** e do gráfico Pareto (**Figura 1.6**), gerado para o modelo final, é possível constatar que não houve alteração da significância das estimativas dos efeitos principais e das interações entre os fatores em relação ao modelo fatorial completo (**Tabela 1.4**).



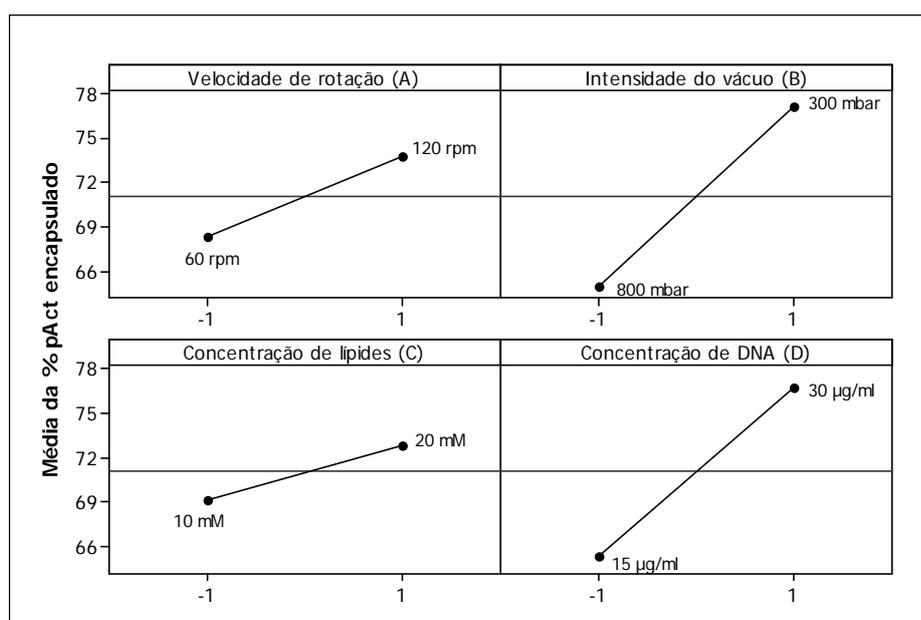
**Figura 1.6-** Gráfico Pareto para os efeitos dos fatores padronizados sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo final.

Na **Figura 1.7** estão apresentados os gráficos de resíduos para o modelo final, ou seja, que inclui apenas as interações significativas. Analisando os gráficos é possível constatar que não há indícios de violação da suposição de que os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct são independentes, normalmente distribuídos e com a mesma variância em cada tratamento.



**Figura 1.7 -** Análise de resíduos para os resultados do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct – modelo final.

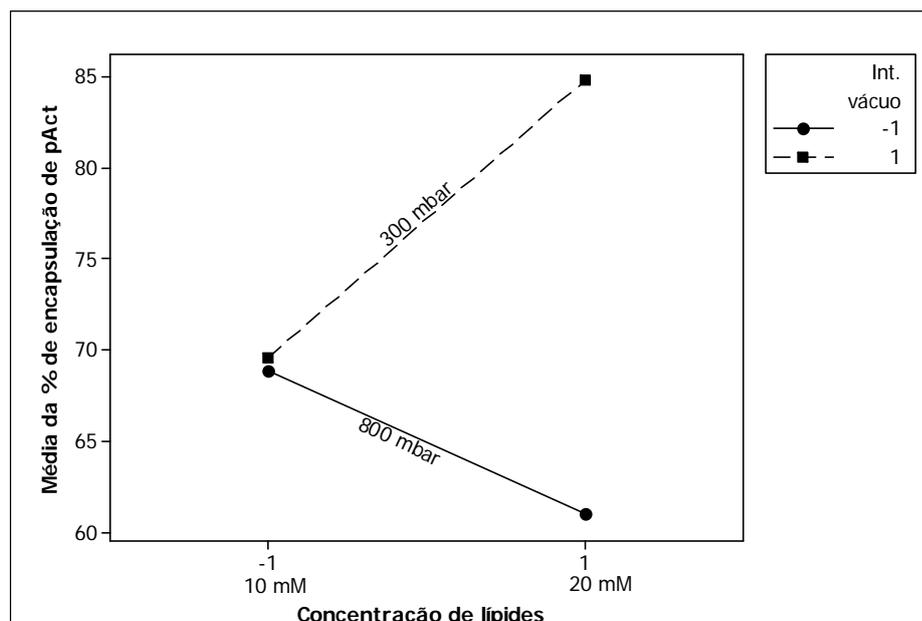
Na **Figura 1.8** estão descritos os gráficos para os efeitos principais dos fatores A, B, C e D. Analisando estes gráficos é possível estimar o quanto que o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos lipossomas é afetado pela mudança do fator do nível baixo (-1) para o nível alto (1). Para os fatores velocidade de rotação (A) e concentração de lípides (C), realizar o experimento no nível alto, pode aumentar o teor de encapsulação de pAct em cerca de 5 e 3 unidades, respectivamente. Por outro lado, a utilização da intensidade do vácuo (B) e da concentração de pAct (D) no nível alto, resultam no aumento do teor de encapsulação de aproximadamente 12 e 11 unidades, respectivamente. Vale ressaltar, que quando os fatores estão envolvidos em interações significativas, os efeitos principais correspondentes apresentam pouco sentido prático.



**Figura 1.8** - Avaliação do efeito principal dos fatores A, B, C e D sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.

Na **Figura 1.9** está descrito o gráfico para a interação de dois níveis mais significativa, entre os fatores intensidade de vácuo e concentração de lípides (BC). Analisando o gráfico é possível dizer que o efeito da intensidade do vácuo sobre o teor de encapsulação de pAct nos lipossomas depende do nível da concentração de lípides. Quando a concentração de lípides está no nível baixo, realizar o experimento com a intensidade de vácuo no nível baixo ou alto não altera, de forma significativa,

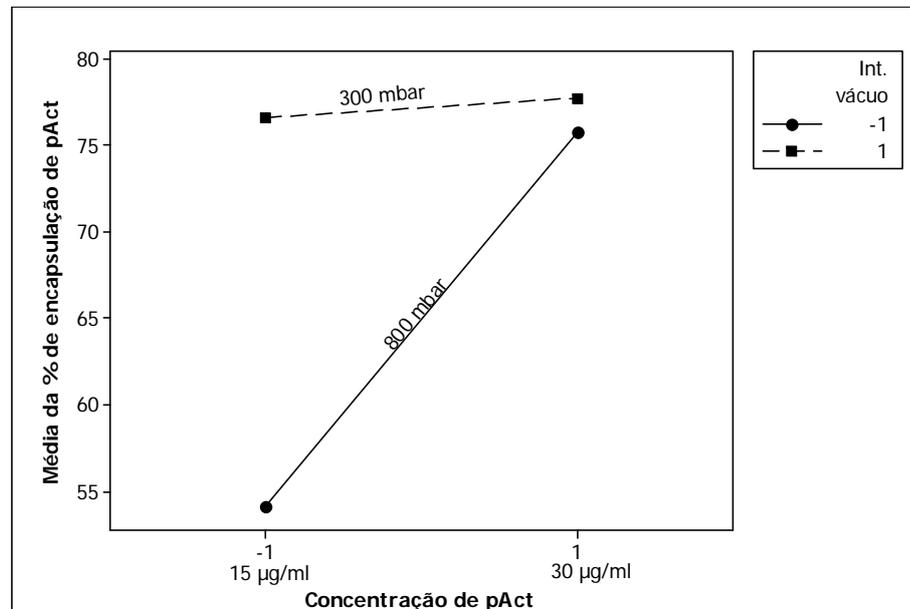
o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos lipossomas, que é cerca de 69%. Por outro lado, quando a concentração de lípides é alta, a utilização do vácuo no nível alto aumenta o teor de encapsulação de 61% para 85%, aproximadamente. Este resultado nos leva a concluir que, dependendo da concentração de lípides no sistema, a utilização do vácuo mais intenso promove a ruptura do gel e a aproximação das monocamadas lipídicas que irão formar as bicamadas dos lipossomas, favorecendo, assim, o aumento do teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos lipossomas. Além disto, vale lembrar que o efeito principal da concentração de lípides e da intensidade de vácuo sobre o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foram de aproximadamente 3 e 12 unidades, respectivamente.



**Figura 1.9 - Avaliação do efeito da interação entre os fatores intensidade de vácuo (B) e concentração de lípides (C) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.**

Na **Figura 1.10** está apresentado o gráfico para a interação entre os fatores intensidade de vácuo e concentração do plasmídeo pAct (BD). De acordo com este gráfico, quando o experimento é realizado com a intensidade de vácuo no nível alto, o teor de encapsulação de pAct praticamente não altera com a mudança de nível da concentração de pAct. Em contrapartida, quando a intensidade de vácuo é baixa, a utilização da concentração de pAct no nível alto favorece o aumento médio do teor

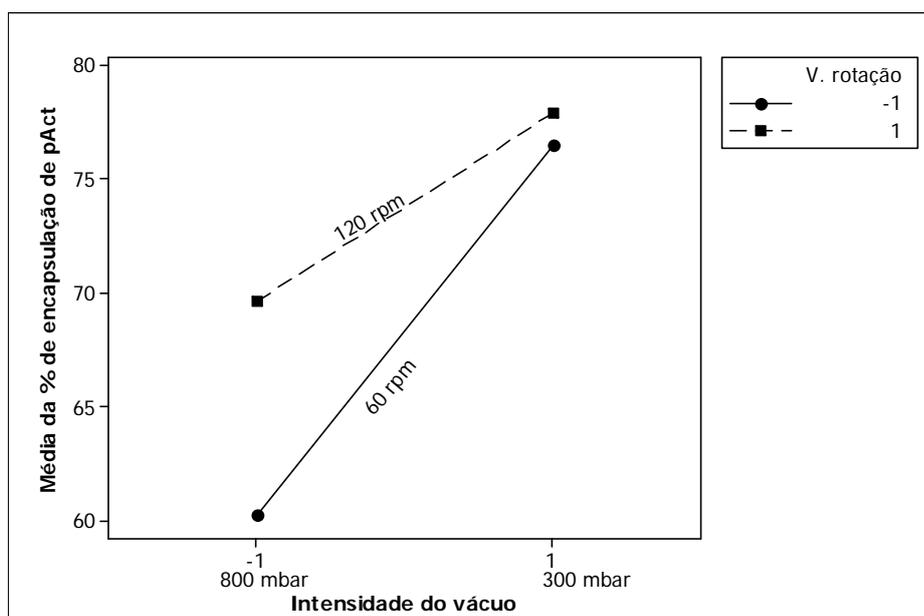
de encapsulação de 54% para 76%, aproximadamente. Este fato pode ser explicado pelo efeito das interações existentes entre os lípides e os constituintes do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct quando a concentração de pAct no sistema é elevada de 15 para 30  $\mu\text{g/mL}$ . Esta interação, de natureza eletrostática ou mediante ligações de hidrogênio, ocorre entre os grupamentos carboxílicos, fosfato e/ou amino presentes na monocamada lipídica interna e os grupamentos amino e/ou hidroxilas da Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e/ou fosfato e amino do plasmídeo pAct. No experimento em que a concentração de pAct é baixa a intensidade do vácuo utilizada passa a exercer um efeito importante sobre o aumento do teor encapsulado de pAct nos LpAct, provavelmente por favorecer a ocorrência destas interações.



**Figura 1.10** - Avaliação do efeito da interação entre os fatores intensidade de vácuo (B) e concentração de pAct (D) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.

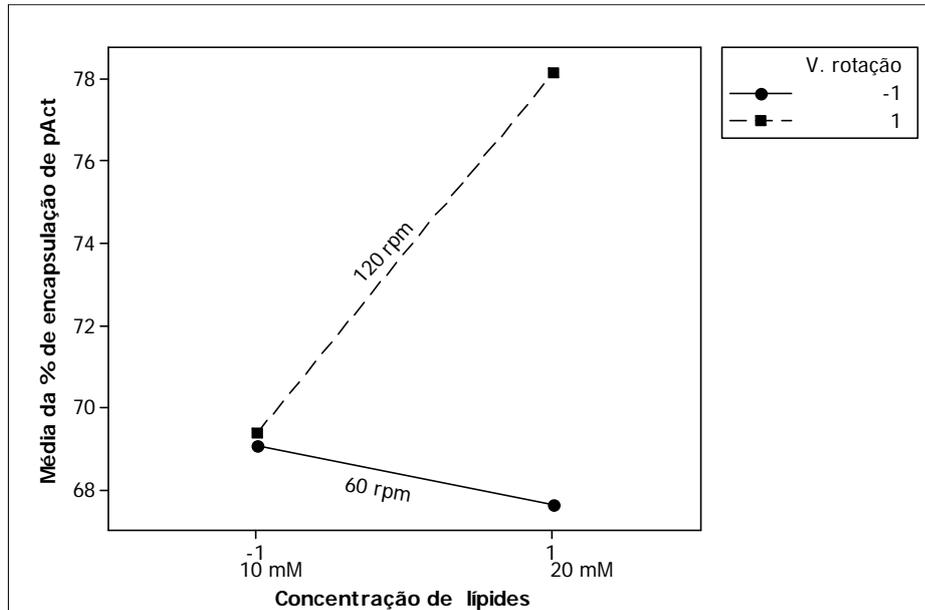
O efeito da velocidade de rotação (A) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct pode ser analisado a partir das interações significativas com os fatores intensidade de vácuo (B) e concentração de lípides (C). Analisando a interação AB (**Figura 1.11**) constata-se que no experimento realizado com a intensidade de vácuo no nível baixo (800 mbar) a mudança na velocidade de rotação de 60 para 120 rpm conduziu a um aumento do teor de encapsulação de 9,4 %, aproximadamente. Por outro lado, quando a intensidade de vácuo utilizada foi de

300 mbar (nível alto), a realização do experimento na velocidade de 60 ou 120 rpm não alterou, de forma significativa, o teor de encapsulação de pAct nos lipossomas. Este resultado nos leva a concluir que o uso de uma rotação maior concomitantemente com o vácuo no nível baixo seja importante para auxiliar no processo de evaporação do éter etílico, com consequente, aproximação das micelas inversas e posterior ruptura das mesmas seguida da formação dos lipossomas.



**Figura 1.11** - Avaliação do efeito da interação entre os fatores velocidade de rotação (A) e intensidade do vácuo (B) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct.

Na **Figura 1.12** estão apresentados os resultados relativos à interação entre os fatores velocidade de rotação e concentração de lípides (AC) sobre o teor de encapsulação do plasmídeo pAct nos LpAct. Analisando esta figura é possível extrair as seguintes informações: quando a concentração de lípides foi utilizada no nível baixo (10 mM) a velocidade de rotação fixada em 60 rpm ou 120 rpm não teve impacto significativo sobre o teor de encapsulação de pAct. Porém, quando a concentração de lípides no experimento foi empregada no nível alto (20 mM) o uso da velocidade de rotação no nível alto elevou o teor de encapsulação de pAct cerca de 10,5 %. Neste caso, pode ser sugerido que o emprego de uma rotação maior (120 rpm) contribuiu para uma melhor dispersão dos lípides durante o processo de formação dos lipossomas, resultando num maior teor de encapsulação de pAct.



**Figura 1.12** - Avaliação do efeito da interação entre a velocidade de rotação (A) e a concentração de lípides (C) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct.

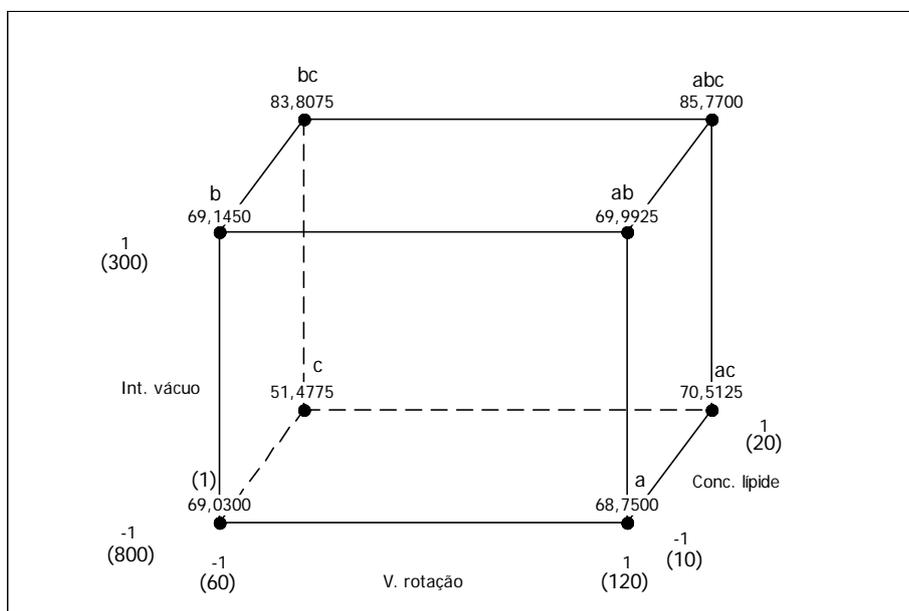
Na **Figura 1.13** encontra-se uma apresentação gráfica da interação de três níveis, entre os fatores velocidade de rotação, intensidade de vácuo e concentração de lípides (ABC). Analisando os vértices do cubo, onde estão representadas as diferentes combinações de tratamento da interação ABC e suas respectivas estimativas para o teor de encapsulação do plasmídeo pAct, é possível extrair as seguintes informações:

- (i) realizar o experimento com os fatores, intensidade de vácuo (B) e concentração de lípido (C), no nível alto conduz aos valores mais altos do teor de encapsulação de pAct (85,7 e 83,8%), independentemente do nível utilizado da velocidade de rotação (A);
- (ii) utilizar apenas a intensidade de vácuo no nível alto ou utilizar, também, a velocidade de rotação no nível alto, quando a concentração de lípides está no nível baixo, conduz a um teor de encapsulação de pAct de, aproximadamente, 70%;
- (iii) realizar o experimento com todos os fatores no nível baixo conduz a um teor de encapsulação do complexo de 69,0%. Aumentar apenas a velocidade de rotação ou aumentar a velocidade de rotação e a concentração de lípides não

altera, de forma significativa, o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos lipossomas;

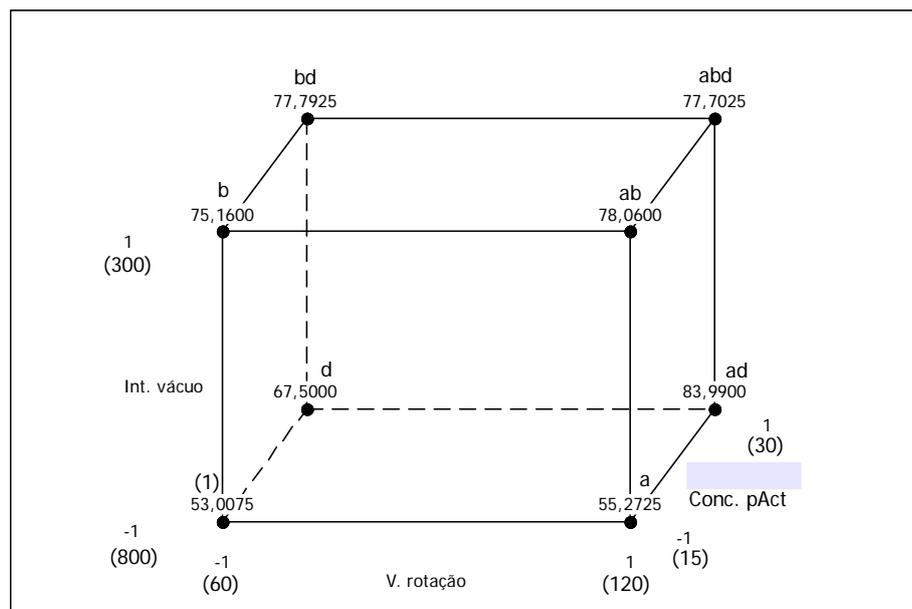
- (iv) conduzir o experimento com a velocidade de rotação e intensidade do vácuo no nível baixo e a concentração de lípide no nível alto, resulta no menor teor de encapsulação de pAct (51,5%).

Os resultados apresentados acima salientam a importância de se conhecer as interações existentes entre os fatores de um experimento, bem como, o grau de significância dos efeitos estimados sobre a variável resposta. No presente estudo, analisando o efeito principal da concentração de lípides (C), vimos que a estimativa atribuída a esse fator em alterar a variável resposta foi a menos significativa (P-valor 0,045), em comparação com os demais fatores. No entanto, analisando as estimativas das respostas considerando o efeito da interação desse fator com a intensidade de vácuo (BC) fica evidente como o teor de encapsulação de pAct nos lipossomas é afetado pelo nível desses fatores.



**Figura 1.13** - Representação gráfica da interação entre os fatores A (velocidade de rotação – rpm), B (intensidade do vácuo – mbar) e C (concentração de lípides – mM) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct.

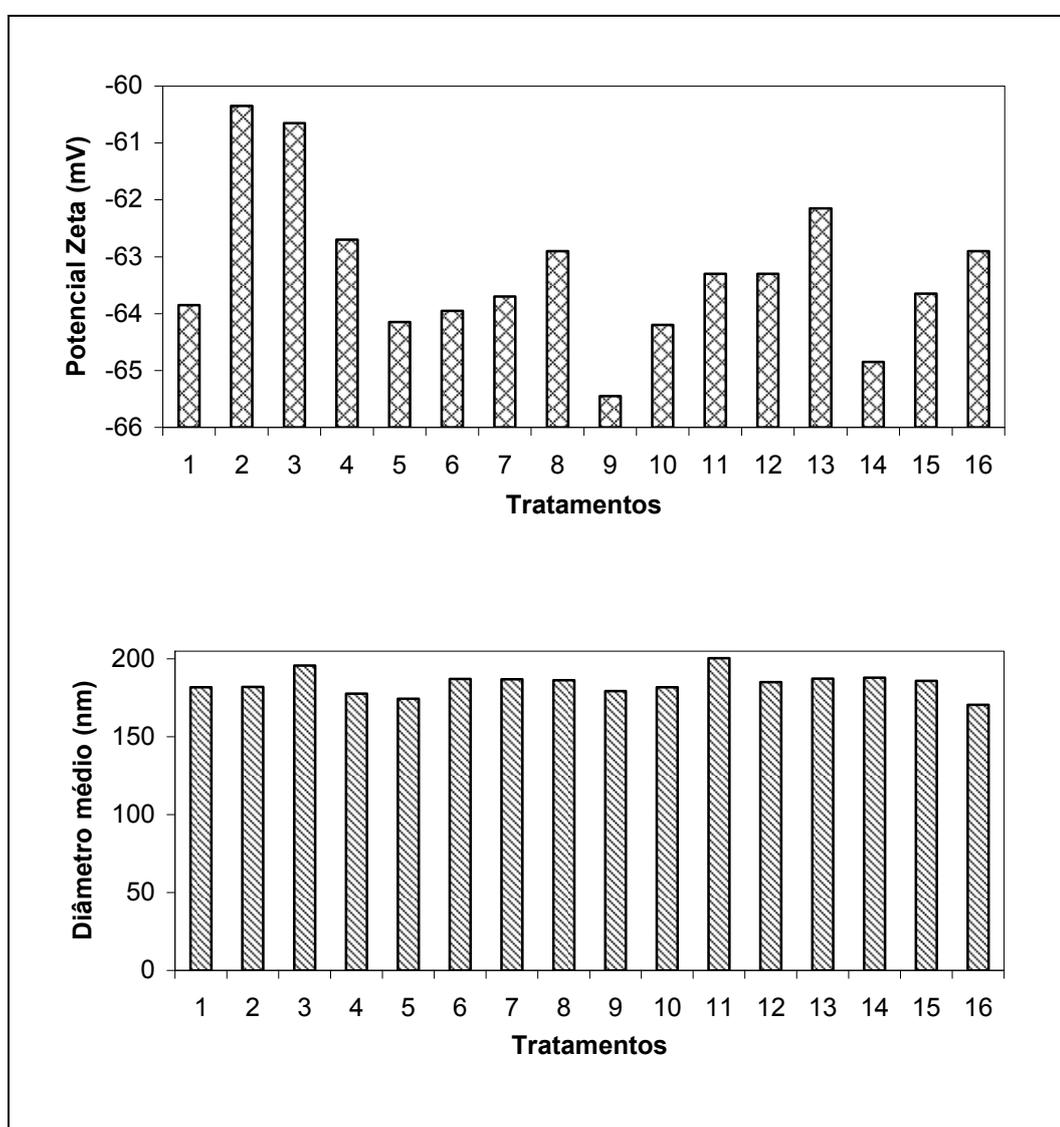
Na **Figura 1.14** estão apresentadas as estimativas das respostas médias para a interação de três níveis, entre os fatores velocidade de rotação, intensidade de vácuo e concentração do plasmídeo pAct. Examinando esta figura, é possível constatar que o maior teor de encapsulação de pAct (83,9%) foi alcançado com a seguinte combinação: velocidade de rotação (A) e concentração de pAct (D) fixados no nível alto e intensidade de vácuo (B) no nível baixo. Analisando a parte superior do cubo, onde a intensidade de vácuo foi utilizada no nível alto em todos os tratamentos, verifica-se que não houve grande variabilidade nos resultados do teor de encapsulação de pAct, o que nos permite concluir que nestes casos o teor de encapsulação não depende dos níveis dos fatores A e D. Por outro lado, na parte inferior do cubo, onde em todos os tratamentos a intensidade de vácuo foi fixada no nível baixo, os resultados foram mais heterogêneos. Os menores resultados do teor de encapsulação (53,0 e 55,3%) foram obtidos nos experimentos em que a concentração de pAct foi fixada no nível baixo. No experimento em que apenas a concentração de pAct foi utilizada no nível alto (*d*) o teor de encapsulação foi de 67,5%, tornando-se evidente, mais uma vez, o efeito das interações promovidas pela concentração de pAct na formulação, quando o nível da intensidade de vácuo utilizado é baixo.



**Figura 1.14** - Representação gráfica da interação dos fatores A (velocidade de rotação – rpm), B (intensidade do vácuo – mbar) e D (concentração de pAct - µg/mL) sobre o teor de encapsulação de pAct nos LpAct.

### 3.3 Diâmetro médio e potencial zeta dos lipossomas LpAct

Na **Figura 1.15** estão apresentados os resultados da média ( $n = 2$ ) dos valores encontrados para o potencial zeta e o diâmetro médio dos LpAct preparados de acordo com os tratamentos descritos na matriz experimental do planejamento fatorial  $2^4$ . Como pode ser constatado o potencial das formulações variou de  $-60$  a  $-66$  mV e o diâmetro dos lipossomas entre 170 a 190 nm, com um índice de polidispersão inferior a 0,2 para todas as amostras, indicando que o sistema é monodisperso.



**Figura 1.15** - Resultados do potencial zeta e do diâmetro médio dos LpAct para os diferentes tratamentos realizados no planejamento fatorial  $2^4$

## **4 CONCLUSÕES**

## 4 CONCLUSÕES

A utilização do experimento fatorial para o desenvolvimento do protocolo de produção dos LpAct por REV permitiu identificar de forma racional os fatores e as interações que influenciam significativamente sobre o teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos lipossomas. Por intermédio deste estudo foi possível definir o valor das variáveis tecnológicas e de formulação levando-se em consideração tanto o teor de pAct encapsulado nos lipossomas quanto os custos de produção relacionados, principalmente, às quantidades de lípidos e DNA usados na formulação.

Dos fatores analisados, a intensidade do vácuo e a concentração do plasmídeo pAct foram os que mais influenciaram o aumento do teor de encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos LpAct. Utilizar um vácuo mais intenso no início do processo de produção dos lipossomas não somente favorece a encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct como reduz a variabilidade no teor de encapsulação. A concentração do plasmídeo pAct no nível alto promove interações no sistema e facilita o processo de encapsulação nos lipossomas.

É possível produzir LpAct com uma concentração encapsulada de pAct em torno de 10,0  $\mu$ g/mL utilizando concentrações de lípidos de 10 mM e de pAct de 15  $\mu$ g/mL desde que, a velocidade de rotação e a intensidade de vácuo sejam ajustadas no nível alto (*ab*). É também possível aumentar a concentração de pAct encapsulada nos LpAct (em torno de 25  $\mu$ g/mL) utilizando concentrações de lípidos de 10 mM e de pAct de 30  $\mu$ g/mL desde que, a velocidade de rotação seja ajustada no nível alto (*ad*).

A velocidade de rotação é um fator que isoladamente não afeta de forma significativa a encapsulação do plasmídeo pAct. O aumento da concentração de lípidos no sistema, quando os outros fatores estão no nível baixo, conduz à diminuição do teor de encapsulação de pAct nos LpAct.

Finalmente, considerando que a utilização do vácuo no nível alto não só promove uma maior encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos lipossomas quanto reduz a variabilidade do teor de encapsulação, nós optamos em produzir os LpAct, para os estudos de transfecção nas células LNCaP, com o seguinte protocolo: velocidade de rotação de 120 rpm, intensidade de vácuo de 300 mbar, concentração de lípides de 10 mM e concentração do plasmídeo pAct de 30  $\mu$ g/mL (*abd*).

## **CAPÍTULO 2**

**ESTUDO DO EFEITO DO pH E DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA SOBRE A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR DOS LIPOSSOMAS LpAct UTILIZANDO DIFRAÇÃO DE RAIOS X DISPERSIVA EM ENERGIA (EDXD)**

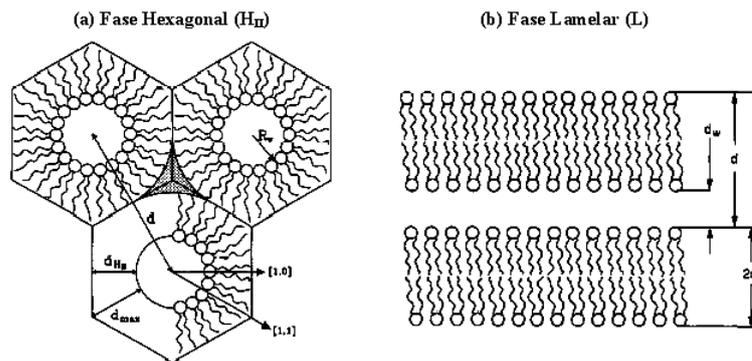
## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Nagle e Tristram-Nagle (2000), do ponto de vista físico, a estrutura básica das membranas biológicas pode ser descrita como um cristal-líquido que possui um comportamento de fase complexo que depende tanto da temperatura (transição termotrópica) quanto da concentração dos lípides (transição liotrópica). As transições que ocorrem naturalmente com os fosfolípides presentes nas biomembranas, ou seja, a transição da fase lamelar (bicamada estável) para outras fases não lamelares tem sido objeto de investigação dos pesquisadores pela suposição da existência de uma relação entre este comportamento termodinâmico dos lípides e o processo de liberação intracelular de genes intermediado por lipossomas. Uma das técnicas que têm sido utilizadas para determinar as transições de fase dos lípides e a sua organização supramolecular, em diferentes condições experimentais, é a difração de raios X.

A técnica de difração de raios X utilizando sistemas convencionais consiste, basicamente, em um feixe de raios X monocromático que incide sobre uma amostra e um detector instalado em um goniômetro, que varre o ângulo de espalhamento e faz a contagem do número de fótons da radiação espalhada para cada ângulo, gerando assim, o espectro de difração. Em geral, tanto o tubo de raios X como o detector variam igualmente o ângulo de incidência e detecção em relação à amostra. Esta técnica é chamada  $\theta - 2\theta$ . No caso de sistemas policristalinos, no entanto, é suficiente variar apenas a posição do detector, mantendo a amostra em um ângulo fixo.

Na **Figura 2.1** pode ser vista uma representação esquemática dos parâmetros estruturais das moléculas da DOPE organizadas na forma hexagonal ( $H_{II}$ ) e na forma lamelar (L). Os modelos de célula unitária apresentados foram construídos a partir da difração de raios X e transformada de Fourier (TURNER e GRUNER, 1992). No corte transversal da estrutura da fase hexagonal,  $d$  corresponde ao espaçamento hexagonal;  $d_{max}$ , o comprimento maior da cadeia lipídica;  $d_{H_{II}}$ , o comprimento menor da cadeia lipídica e  $R_w$  a medida de raio do centro aquoso. Para lipossomas organizados na fase lamelar,  $d$  corresponde à espessura da lamela;  $d_w$ , à espessura da porção hidrofílica e  $d_l$  à espessura da bicamada.



**Figura 2.1 - Representação esquemática das moléculas do DOPE organizadas na fase hexagonal (HII) e na fase lamelar (L) segundo TURNER e GRUNER, 1992.**

A partir das medidas de difração de raios X é possível determinar a fase em que o sistema lipídico se encontra estudando as distâncias intermoleculares obtidas mediante a aplicação da lei de Bragg em difratogramas de pó da amostra. A Lei de Bragg refere-se a equação:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

onde  $d$  é a distância entre os planos cristalinos;  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe de raios X incidente;  $\theta$  é o ângulo de incidência; e  $n$  é um número inteiro de ordem de difração. Um padrão de difração com razões de distâncias intermoleculares iguais a 1, 2, 3, 4..., significa que as moléculas dos lípides estão organizadas na fase lamelar, para razões iguais a 1,  $\sqrt{3}$ , 2,  $\sqrt{7}$ , 3,  $\sqrt{12}$ ,  $\sqrt{13}$ ..., a organização é hexagonal e para razões iguais a 1,  $\sqrt{2}$ ,  $\sqrt{3}$ , 2,  $\sqrt{5}$ ,  $\sqrt{6}$ ,  $\sqrt{8}$ , 3..., a organização é cúbica (SEDDON, 1990).

Embora a técnica tradicional de difração de raios X seja um método eficiente na identificação das fases cristalinas, este tipo de medida requer tempo, pois é necessário mover o detector em toda a faixa de ângulos  $2\theta$ , onde se espera encontrar picos estruturais da amostra. Em sistemas fracamente ordenados, como é o caso dos lípides, isto implica em longo tempo de medida e exposição da amostra. Para compensar esta desvantagem, muitas vezes as medidas de difração são realizadas por um método conhecido como difração de raios X dispersiva em energia. Na técnica de EDXD o feixe de raios X utilizado não é monocromático, isto

é, ele é composto por um conjunto de feixes com diferentes comprimentos de onda. Este tipo de feixe é conhecido como feixe branco. Por não passar por sistemas de monocromatização, este feixe é mais intenso que os feixes monocromáticos, de tal maneira que uma maior intensidade incide sobre a amostra. Além desta vantagem, a utilização de um detector que discrimina em energia permite a varredura em espaço recíproco em ângulos fixos, com tempo de exposição da ordem de alguns minutos, ou seja, todo espaço recíproco é varrido de uma vez (BODENTHIN *et al.*, 2002). O detector fica na posição fixa e os picos de Bragg são observados em valores de energia que atendam a condição de difração. Neste caso, a lei de Bragg é reescrita da seguinte forma:

$$n \cdot 12,3986/E = n\lambda = 2d \sin 2\theta/2$$

$$2d = n \cdot 12,3986 / (E \sin 2\theta/2)$$

onde 12,3986 é uma constante utilizada para conversão de energia E (em kilo elétron-volts) para comprimento de onda  $\lambda$  (em Angstroms), de tal forma que  $\lambda$  (Å) = 12,3986 / E (keV). Assim sendo, para um ângulo fixo  $2\theta$  é possível determinar d a partir dos máximos de intensidade em função da energia.

Nas medidas de difração de raios X a intensidade do feixe de raios X espalhado é medida em função do vetor de transferência de momento  $q$  ( $=4\pi E \sin(2\theta/2) / 12,3986$ ) mantendo fixos o ângulo de incidência e de detecção.

O sistema de EDXD tem sido utilizado por alguns pesquisadores (Caracciolo *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2006) para determinar a estrutura supramolecular de sistemas de liberação lipossomais, com o objetivo de relacionar os parâmetros de cristalinidade com a eficiência de transfecção das formulações.

Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de EDXD para avaliar a organização supramolecular dos lipossomas compostos de DOPE:CHEMS. As amostras foram preparadas para investigar o efeito do pH, da presença do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct, dos componentes do meio de cultura e do soro fetal bovino sobre a

organização estrutural das moléculas de DOPE. O objetivo desta investigação é poder relacionar as informações estruturais do sistema com a sua capacidade de transfecção.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

- Tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4 e 5,0
- Meio de cultura (MC) - RPMI 1640 pH 7,4 e 5,0
- Meio de cultura completo (MCC) - RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) pH 7,4 e 5,0.

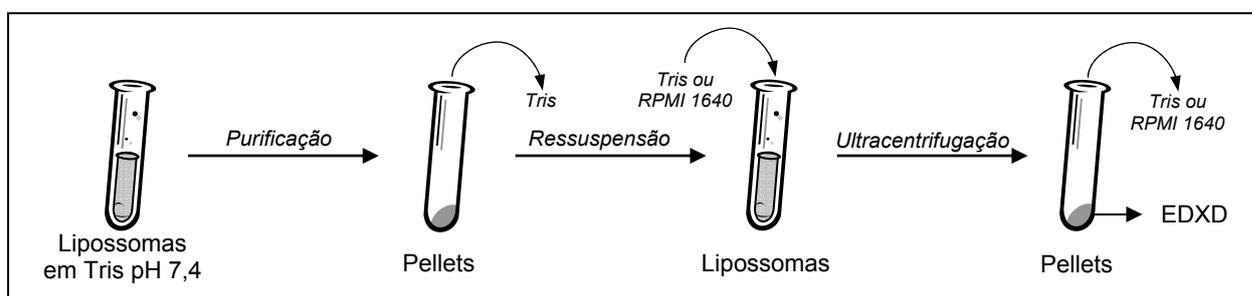
### 2.2 Preparação dos lipossomas

Para o estudo estrutural dos lipossomas por EDXD foram preparados dois tipos de amostras: os lipossomas brancos (LBr), sem DNA, e os LpAct. Estes lipossomas, compostos de DOPE/CHEMS na razão molar 6/4, respectivamente, foram preparados com a concentração lipídica total de 20 mM.

A solução contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct foi preparada com a concentração de pAct igual a 25  $\mu$ g/mL, como descrito no Capítulo 1, item 2.4.3. Os lipossomas foram produzidos por REV como relatado no item 2.5 do Capítulo 1. O volume dos reagentes utilizados para a preparação de 1,0 mL dos LBr e LpAct foram os seguintes: para a formação do filme lipídico foram utilizadas alíquotas de 0,4 mL de cada uma das soluções em clorofórmio dos fosfolípidos (DOPE 0,030 mmol/mL e CHEMS 0,020 mmol/mL). O volume de NaOH 0,1M utilizado para ionização do CHEMS foi de 0,080 mL. Para a obtenção da emulsão A/O foram utilizados 0,92 mL da solução do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4, para os LpAct, e 0,92 mL do tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4, para os LBr. As condições para a evaporação do éter etílico e produção dos lipossomas foram: inicialmente, um vácuo com intensidade de 600 mbar por 3 horas e, em seguida, de 100 mbar por 1 hora. Após o preparo, os lipossomas foram extrusados conforme descrito na etapa 3 do item 2.5 do Capítulo 1.

### 2.3 Preparação dos *pellets* dos LBr e LpAct

As medidas de EDXD foram realizadas nos *pellets* dos lipossomas obtidos após o processo de preparação descrito na **Figura 2.2**. Inicialmente, as amostras extrusadas dos LBr e LpAct foram purificadas por ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 min a 4 °C. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e um volume de solução, igual ao do sobrenadante, foi adicionado aos *pellets*. As soluções utilizadas foram: tampão Tris-NaCl 50 mM ou meio de cultura RPMI 1640, com e sem a presença de 10% de SFB, ambas nos valores de pH de 7,4 ou 5,0. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex, para a ressuspensão dos lipossomas e, em seguida, foram submetidas, novamente, à ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 min a 4 °C. Finalmente, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* das amostras analisados por EDXD.

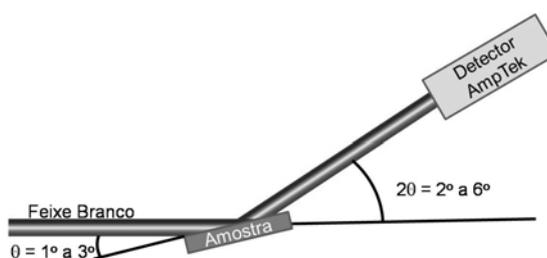


**Figura 2.2** - Processo para o preparo das amostras de LBr e LpAct utilizadas nas análises por EDXD.

### 2.4 Realização das medidas de EDXD

As medidas de EDXD foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, na linha D09B-XRF, onde todos os elementos óticos podem ser retirados do caminho do feixe, permitindo que a amostra seja iluminada com amplo espectro de radiação, desde 3 keV até aproximadamente 20 keV. A amostra foi mantida em um ângulo fixo com baixa inclinação, de 1° a 3°, enquanto que o detector era posicionado em um ângulo  $2\theta$  sempre o dobro do ângulo de incidência

sobre a amostra (**Figura 2.3**). O detector utilizado foi o AmpTek com resolução em energia de aproximadamente 200 keV, calibrado com uma fonte padrão de  $\text{Fe}_{53}$  que emite em 6,403 keV, de tal forma que  $E \text{ (keV)} = (0,1533 + 0,01416 \times \text{Canal}) \text{ keV}$ , onde canal corresponde à saída do detector. As amostras foram depositadas em um substrato de silício e as medidas foram realizadas nos ângulos  $\theta/2\theta$  igual a 1/2, 2/4 e 3/6. Os espectros com melhor resolução foram obtidos com o ângulo  $\theta/2\theta$  igual a 2/4, o qual foi escolhido para a apresentação dos resultados. A fórmula utilizada para o cálculo das distâncias intermoleculares foi  $d = 2\pi/q$ . Antes da análise das amostras, o substrato foi avaliado quanto à sua interferência nas medidas a serem realizadas e constatou-se que ele não contribuiu com nenhum pico de difração nas condições utilizadas.



**Figura 2.3** - Esquema ilustrativo da montagem utilizada na difração de raios X dispersiva em energia na linha XRF do LNLS.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise por EDXD da organização supramolecular do DOPE nas amostras de LBr

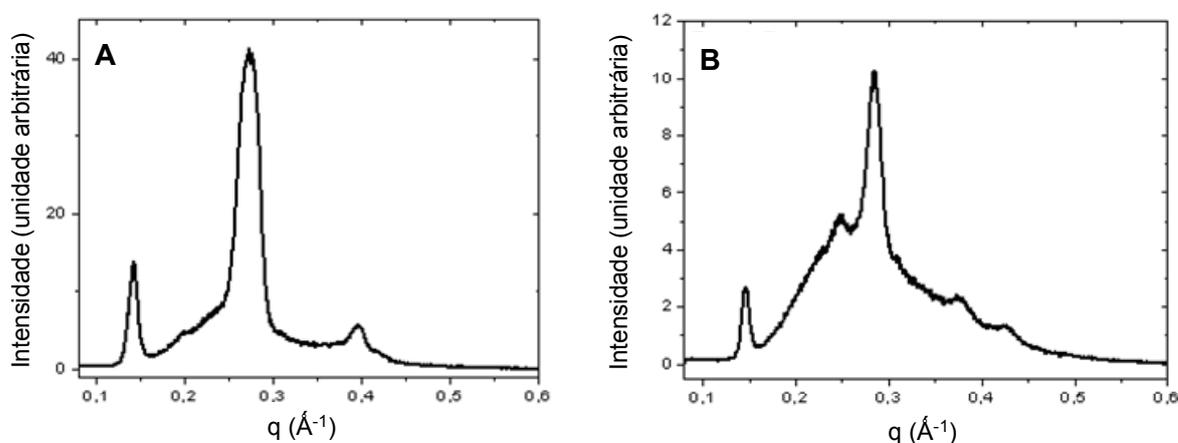
##### 3.1.1 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LBr preparados em tampão Tris pH 7,4 e 5,0

Inicialmente, foi investigado o efeito do pH sobre a organização supramolecular das moléculas de DOPE nos LBr. Na **Figura 2.4** estão apresentados os espectros de EDXD das amostras preparadas em tampão Tris pH 7,4 (A) e em pH 5,0 (B). Para todos os espectros a periodicidade das reflexões de Bragg foi calculada por intermédio da fórmula  $d = 2\pi/q$ .

No padrão de difração dos LBr preparados em tampão Tris pH 7,4 (**Figura 2.4 - A**) é possível constatar a presença de três picos largos localizados em  $q = 0,142$ ;  $0,271$  e  $0,398 \text{ \AA}^{-1}$ . Estes picos correspondem a um espaçamento de rede iguais a  $44,2$ ;  $23,2$  e  $15,8 \text{ \AA}$ , com razões de reflexão de Bragg em torno de 1, 2 e 3, indicando a organização das moléculas da DOPE numa fase lamelar. O valor encontrado da espessura da bicamada lipídica de  $44,2 \text{ \AA}$  está de acordo com os dados relatados por De Oliveira e colaboradores (1998 e 2000), para os lipossomas aniônicos compostos de DOPE/AO/CHOL. Nos trabalhos realizados por Amenitsch e colaboradores (2011), uma espessura equivalente para a bicamada lipídica ( $45,5 \text{ \AA}$ ) foi determinada por difração de raios X em baixo ângulo (SAXS) em lipossomas catiônicos compostos de DC-CHOL/DOPE.

No espectro de EDXD das amostras de LBr preparados em tampão Tris pH 5,0 (**Figura 2.4 - B**) é possível observar mudanças estruturais em relação às amostras preparadas em pH 7,4 (**Figura 2.4 - A**). As moléculas do DOPE estão organizadas na forma hexagonal, pois é possível identificar razões de reflexão de Bragg iguais a 1,  $\sqrt{3}$ , 2,  $\sqrt{7}$  e 3 ( $0,145$ ;  $0,249$ ;  $0,284$ ;  $0,380$  e  $0,425 \text{ \AA}^{-1}$ ). A transição das moléculas

da DOPE da fase lamelar para hexagonal pode ser explicada pela redução do pH do meio. É sabido que as moléculas de CHEMS, quando ionizadas, induzem a uma repulsão eletrostática entre seus grupos carboxílicos e os grupos fosfatos das moléculas da DOPE. Este fato inibe a formação das ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato e amônio das moléculas da DOPE, responsáveis pela tendência do DOPE adotar a fase hexagonal invertida. Em pH 5,0, as moléculas de CHEMS são protonadas conduzindo, assim, à uma desestabilização da bicamada lipídica.

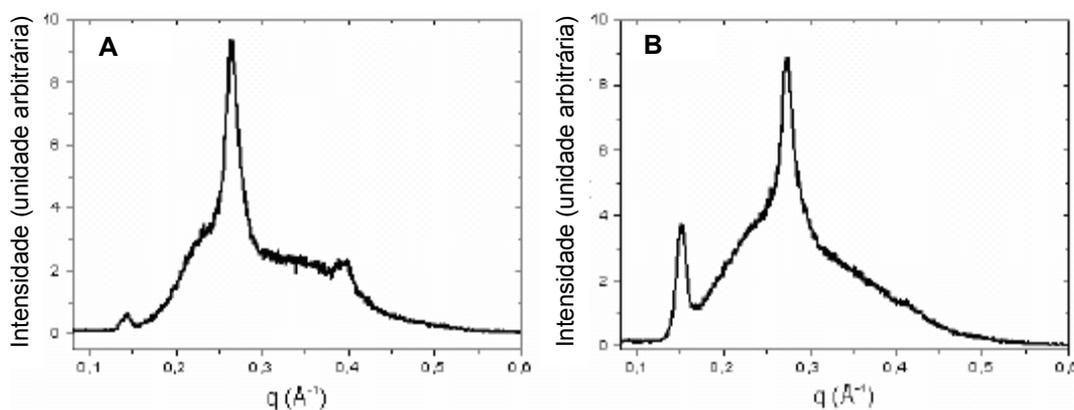


**Figura 2.4** – Espectro EDXD dos LBr preparados em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7.4 (A) e pH 5.0 (B).

### **3.1.2 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LBr preparados em meio de cultura pH 7,4 e 5,0**

O comportamento de fase das moléculas da DOPE na presença dos constituintes do meio de cultura (MC) é visualizado nos espectros de EDXD da **Figura 2.5**. Em MC pH 7,4 (**Figura 2.5 - A**) são identificados três picos em  $q = 0,143; 0,265$  e  $0,398 \text{ \AA}^{-1}$ , com distâncias interplanares em torno de 43,9; 23,7 e 15,8  $\text{\AA}$ , respectivamente. A periodicidade das reflexões de Bragg é de, aproximadamente, 1, 2 e 3, o que caracteriza a presença das moléculas da DOPE na fase lamelar. Comparando o padrão de difração destes lipossomas com o dos lipossomas em tampão Tris pH 7,4 (**Figura 2.4 - A**) é possível constatar um alargamento e diminuição da intensidade dos picos de difração sugerindo a existência de interação entre os constituintes do

meio de cultura e os lípides, o que conduz à formação de estruturas menos ordenadas. Um resultado oposto é apresentado por Esposito e colaboradores (2006) para os lipossomas compostos de brometo de dimetiloctadecilamônio (DDAB)/DOPE e DDAB/DOPE/DNA. Neste trabalho, os autores avaliaram por EDXD amostras destes lipossomas preparados em água e em meio de cultura DMEM. O padrão de difração das amostras revelou a presença de uma estrutura multilamelar nas duas preparações, porém, os espectros das amostras preparadas em DMEM apresentaram melhor resolução do que os das amostras preparadas em água. Os autores concluíram que os constituintes do meio de cultura favoreceram a formação de um arranjo supramolecular mais organizado dos lípides, quando comparado com a água. No espectro de EDXD dos LBr preparados em MC pH 5,0 (**Figura 2.5 - B**) é possível constatar o desaparecimento do pico em  $q \approx 0,40 \text{ \AA}^{-1}$  e aumento da intensidade do pico principal que aparece em  $q = 0,152 \text{ \AA}^{-1}$ . Os valores das razões de reflexão de Bragg também são próximas a 1 e  $\sqrt{3}$  ( $d = 41,3$  e  $23,0 \text{ \AA}$ ) indicativo da presença da DOPE na fase hexagonal.



**Figure 2.5** – Espectro EDXD dos LBr preparados em meio de cultura pH 7.4 (A) e pH 5.0 (B).

## 3.2 Análise por EDXD da organização supramolecular do DOPE nas amostras de LpAct

### 3.2.1 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LpAct preparados em tampão Tris pH 7,4 e 5,0

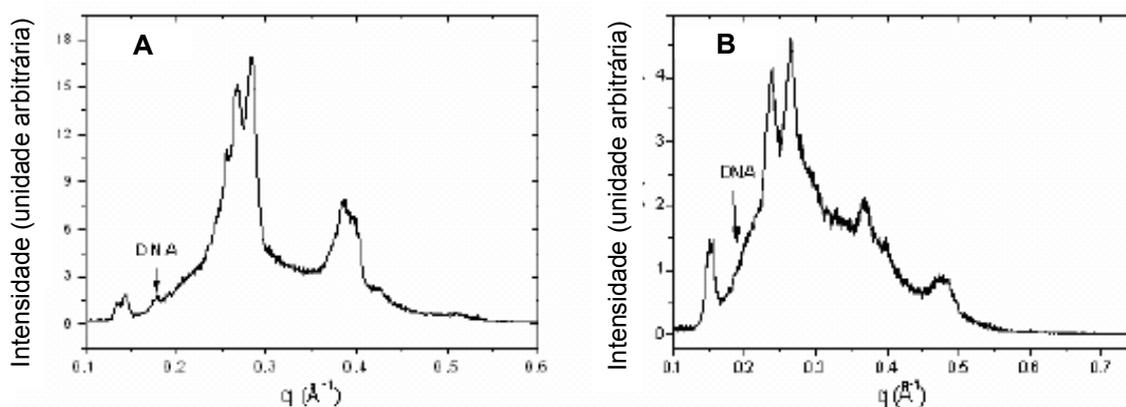
O efeito da encapsulação do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct (pAct = 25  $\mu$ g/mL) no padrão de difração dos lipossomas pH-sensíveis compostos de DOPE/CHEMS pode ser visto na **Figura 2.6**. Para as amostras preparadas em tampão Tris pH 7,4 (**Figura 2.6 - A**) é possível identificar a presença de dois domínios. O primeiro, levando em consideração os picos localizados em  $q = 0,134; 0,268$  e  $0,401 \text{ \AA}^{-1}$ , para o qual foram identificadas razões de reflexão de Bragg iguais a 1, 2 e 3, o que indica a presença de fase lamelar das moléculas de DOPE. O segundo domínio, compreendendo os picos localizados em  $q = 0,144; 0,257; 0,282; 0,385$  e  $0,425 \text{ \AA}^{-1}$ , para os quais foram identificadas razões de reflexão de Bragg iguais a 1,  $\sqrt{3}$ , 2,  $\sqrt{7}$  e 3 indicando a presença de fase hexagonal das moléculas de DOPE. Além disto, pode ser observado um pico localizado a  $q \approx 0,180 \text{ \AA}^{-1}$ , sugerindo a presença de moléculas de DNA, com o espaçamento interhelical de 35  $\text{\AA}$  ( $d_{\text{DNA}}$ ). Valores semelhantes para  $d_{\text{DNA}}$  foram determinados por EDXD nas amostras de lipossomas compostos de DOPE/DOTAP/CHOL e dioleilfosfatidilcolina (DOPC)/DOTAP, nos estudos realizados por Caracciolo e colaboradores (2002 e 2003). Com relação à constatação da presença das moléculas da DOPE na fase lamelar e hexagonal, este fato pode ser explicado por uma distribuição heterogênea das moléculas de DOPE na membrana lipossomal como consequência das interações eletrostáticas entre os grupos amino das moléculas de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e/ou fostato das moléculas de DNA com os grupos carboxílicos das moléculas de CHEMS e/ou amino das moléculas de DOPE. A ausência das moléculas de CHEMS entre as da DOPE conduz a uma aproximação entre estas, favorecendo a formação da fase hexagonal. Resultados similares demonstrando a formação de um sistema bifásico, em decorrência de interações entre os componentes do sistema lipossomal, foram descritos por De Oliveira e colaboradores (1998 e 2000). Neste trabalho, os autores utilizaram a difração de raios X acoplada com a calorimetria exploratória diferencial (DSC) para avaliar a influência da presença de moléculas de oligonucleotídeo 15-mer (ODN)

sobre o comportamento de fase das moléculas da DOPE, em lipossomas compostos por DOPE/AO/CHOL. O primeiro estudo foi realizado em amostras com baixa hidratação e o segundo em amostras hidratadas. Os autores concluíram que as fortes interações eletrostáticas entre os grupos amino das moléculas da DOPE e os fosfatos das moléculas de ODN conduziram à separação das moléculas da DOPE e AO nas fases hexagonal e lamelar. É sabido que a transição das moléculas da DOPE, da fase lamelar para a hexagonal, conduz a uma desestabilização da membrana lipossomal e à formação de agregados, que podem ser identificados pelo aparecimento de precipitados nas amostras. No nosso estudo, consideramos que a fração de lípidos organizada na fase hexagonal não foi muito extensa, pois não foi observada a presença de agregados nas amostras e o diâmetro médio dos LpAct, em pH 7,4, foi igual a 159 nm.

Outros arranjos estruturais dos lipossomas decorrentes da interação das moléculas de DNA com as bicamadas lipídicas são descritos na literatura. Nos estudos utilizando EDXD, Caracciolo e colaboradores (2002 e 2003) demonstram que os lipossomas catiônicos compostos de DOTAP/DOPC/DNA e DOTAP/DOPE/CHOL/DNA se organizam em uma estrutura multilamelar, na qual as moléculas de DNA são condensadas entre duas bicamadas lipídicas. Neste complexo, formado pela interação do grupamento lipídico catiônico com os grupos fosfatos do DNA, a distância entre as bicamadas lipídicas e entre as fitas de DNA dependem da razão lípido/DNA. A força de repulsão entre as bicamadas lipídicas é que determina a quantidade de lípido que o complexo pode acomodar. Quando há excesso de lípido, eles se separam da bicamada e, no espectro EDXD é possível constatar a presença de duas fases, uma referente à estrutura multilamelar do complexo e a outra aos lípidos puros. A mesma organização multilamelar entre as moléculas de DNA e os lipossomas compostos de DOTAP/DOPC e DOTAP/DOPE é proposto por Rädler e colaboradores (1997). Francescangeli e colaboradores (2004) descrevem uma organização supramolecular do tipo hexagonal invertida para o complexo ternário formado de DOPE/DNA/Fe<sup>2+</sup>. Neste arranjo, as fitas de DNA preenchem o espaço aquoso de uma estrutura cilíndrica formada pelas moléculas de DOPE, enquanto o metal cátion estabiliza o conjunto por intermédio da formação de uma ligação entre a porção polar das moléculas de DOPE e os grupamentos fosfatos do DNA. Koltover e colaboradores (1998) propuseram esta mesma

organização estrutural para os lipossomas catiônicos compostos de DOTAP/DOPE quando a fração de DOPE/(DOPE+DOTAP) era maior do que 0,7. O mesmo arranjo estrutural foi também observado para os lipossomas catiônicos compostos de DC/CHOL/DOPE/DNA (CONGIU *et al.*, 2004).

O efeito da redução do pH sobre a organização supramolecular da membrana dos LpAct é mostrado no espectro EDXD da **Figura 2.6 - B**. Em tampão Tris pH 5,0, foram identificados picos em  $q = 0,154; 0,266; 0,403$  e  $0,468 \text{ \AA}^{-1}$ , os quais correspondem às razões de reflexão de Bragg iguais a  $1, \sqrt{3}, \sqrt{7}$  e  $3$ , indicando a organização das moléculas da DOPE na fase hexagonal. Este dado é importante pois sugere que as interações eletrostáticas entre o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/DNA e os lípides da bicamada não impedem a ocorrência da transição das moléculas do DOPE da fase lamelar para hexagonal, ou seja, a pH-sensibilidade dos LpAct não foi alterada pela presença do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct. Além disto, dois picos podem ser observados em  $q = 0,238$  e  $0,368 \text{ \AA}^{-1}$ , com razões de reflexão de Bragg próximas de  $1$  e  $\sqrt{2}$ , indicando a presença de estruturas não lamelares.



**Figure 2.6** – Espectro EDXD dos LpAct preparados em tampão Tris NaCl 50 mM pH 7,4 (A) e pH 5,0 (B).

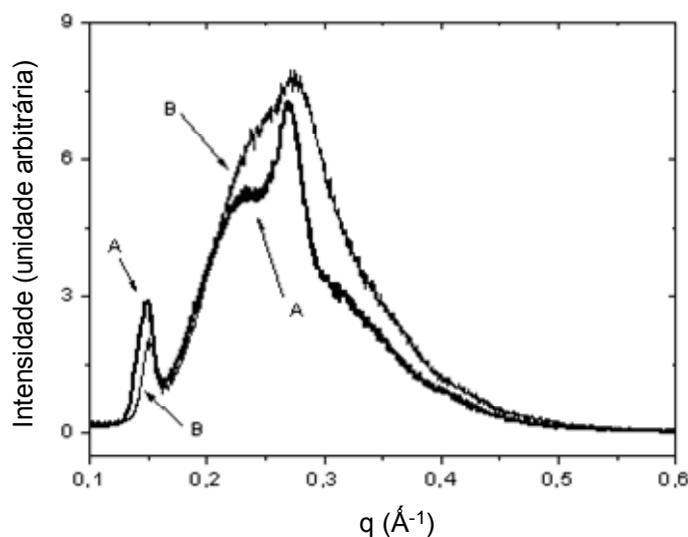
### **3.2.2 Estudo comparativo dos espectros de EDXD dos LpAct preparados em meio de cultura completo a pH 7,4 e 5,0**

Na **Figura 2.7** estão apresentados os espectros de EDXD das amostras dos LpAct preparados em MCC. Em pH 7,4 (seta A), é possível identificar três picos largos para os quais não foi possível estabelecer razões de reflexão de Bragg. Este fato sugere que as proteínas do SFB presentes no MCC interagem com os constituintes dos lipossomas formando estruturas menos ordenadas. Vale ressaltar, que este nível de desorganização supramolecular das moléculas de DOPE não foi observado para os LBr preparados em meio de cultura sem proteínas (**Figura 2.5**). Entretanto, a presença das proteínas parece não comprometer as vesículas dos LpAct, uma vez que, o diâmetro médio medido por espectroscopia de correlação de fótons foi igual a 158 nm.

Nos recentes trabalhos de Caracciolo e colaboradores (2010) e de Amenitsch e colaboradores (2011), foi relatado que o sistema composto por DC-CHOL/DOPE/DNA mostrou uma eficiência de transfecção maior do que outras formulações catiônicas em presença de SFB. A estabilidade deste complexo catiônico no SFB foi atribuída à presença do derivado do colesterol (DC-CHOL), responsável por aumentar a densidade de compactação dos fosfolípides e reduzir sua permeabilidade aos solutos. Quanto ao aumento da eficiência de transfecção, a explicação sugerida pelos autores está associada ao tipo de arranjo supramolecular dos lípides e DNA, originando sistemas híbridos. O sistema catiônico formado por DC-CHOL/DOPE/DNA mostrou ser capaz de interagir com as proteínas plasmáticas sem conduzir à desestruturação das nanoestruturas. Os autores sugerem que uma fração das moléculas de DNA se adsorve na superfície do nanossistema, permitindo a ocorrência de interações eletrostáticas com as proteínas. Portanto, a organização supramolecular deste nanossistema consiste numa mistura de estrutura multilamelar, na qual as moléculas de DNA encontram-se acomodadas entre as bicamadas lipídicas, e de vesículas lipossomais intactas contendo moléculas de DNA adsorvidas à sua superfície. Este sistema híbrido apresenta uma grande habilidade de fusão com a membrana endossomal, o que certamente explica a sua maior eficiência de transfecção.

No caso dos LpAct aniônicos ( $\zeta$ -potencial =  $-58$  mV), pode-se supor que a afinidade observada das proteínas pela membranas é decorrente de interações eletrostáticas. Além disto, o pico relativo à organização estrutural das moléculas de DNA não foi observado no espectro EDXD destes lipossomas, sugerindo que o empacotamento das moléculas de DNA na bicamada lipídica foi alterado pelas interações da membrana lipossomal com os componentes do MCC.

Em pH 5,0 (**Figura 2.7 - seta B**) a estrutura das moléculas de DOPE é mais desordenada, evidenciada pelo alargamento dos picos e o desaparecimento do pico a  $q \approx 0,24 \text{ \AA}^{-1}$ . Apesar da existência de interações entre os lípides da membrana lipossomal e as proteínas do SFB a pH-sensibilidade dos LpAct parece não ter sido comprometida. Esta suposição será confirmada nos estudos de transfecção utilizando estes lipossomas em presença ou não das proteínas do soro.



**Figure 2.7** – Espectro EDXD dos LpAct preparados em meio de cultura completo contendo 10% de SFB a pH 7,4 (seta A) e pH 5,0 (seta B).

## **4 CONCLUSÕES**

## 4 CONCLUSÕES

O espectro de EDXD dos LpAct em pH 7,4 é diferente daquele obtido para os LBr. Este fato demonstra que existe uma quantidade suficiente de moléculas de DNA na cavidade aquosa dos lipossomas capaz de mudar o arranjo estrutural dos lípides e, conseqüentemente, alterar o comportamento de fase das moléculas de DOPE.

O presente estudo demonstrou que o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct interage com a membrana lípidica dos lipossomas resultando na presença das fases lamelar e hexagonal em pH fisiológico. Entretanto a ocorrência da transição de fase das moléculas de DOPE de lamelar para hexagonal, em pH 5,0, não foi abolida.

Em meio ácido, como ocorre no interior dos endossomas, a formação da fase hexagonal existe. Esta constatação é importante para mostrar que, apesar da existência de interações entre os lípides e o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/DNA, a liberação citoplasmática das moléculas de DNA, a partir dos LpAct, parece não ter sido influenciada.

A exposição dos LpAct às proteínas do SFB alterou o arranjo supramolecular das moléculas de DOPE, tanto em pH 7,4 quanto em 5,0. Nestas condições uma organização menos ordenada dos lípides foi observada, o que não permitiu a identificação de fases usando EDXD. Entretanto, em pH 5,0, uma desorganização mais pronunciada foi observada, o que sugere que a pH-sensibilidade dos lipossomas não foi alterada.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA CAPACIDADE DE TRANSFECCÃO DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS LNCaP**

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Antes dos ensaios de transfecção, a avaliação da citotoxicidade do agente em estudo é fundamental para determinar o intervalo de concentração do sistema que poderá ser utilizada nos experimentos. Um dos testes mais usados para a avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos sistemas é o MTT, que utiliza o reagente 3- $\{[4,5\text{-dimetiltiazol-2-il}]-2,5\text{-brometo de difeniltetrazólio}\}$ , conhecido como sal de tetrazólio. O ensaio colorimétrico desenvolvido com este reagente tem como fundamento a redução da molécula do MTT (solúvel em água) pela enzima succinil desidrogenase, presente no interior da mitocôndria, a um produto denominado formazan (insolúvel em água). Após o contato das células com concentrações variadas do sistema carreador, os cristais de formazan são extraídos das células por meio de solvente apropriado e, em seguida, quantificados por espectrofotometria na região do visível (BELLAMY, 1992). A viabilidade celular ou a citotoxicidade deste sistema é determinada, uma vez que, apenas as células que permanecerem viáveis após o contato, podem realizar esta conversão enzimática (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

A capacidade de um sistema carreador em transferir material genético para o interior celular pode ser avaliada por intermédio do uso de genes repórteres. Estes genes codificam uma proteína específica, que pode ser identificada e quantificada nas células. Desta forma, a proteína produzida atuará como marcador para confirmar a transferência de transgenes para o interior celular. A proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP) é uma importante molécula repórter usada para monitorar a expressão de genes e/ou a localização de proteínas nos sistemas biológicos. A proteína GFP, extraída da água viva *Aequorea victoria*, emite uma luz verde brilhante (comprimento de onda máximo igual a 509 nm) quando excitada com luz UV ou azul (comprimento de onda máximo igual a 395 nm). Diferente dos outros marcadores bioluminescentes, o cromóforo presente na GFP é intrínseco à estrutura primária da proteína e a fluorescência da GFP não requer um substrato ou cofator. A fluorescência da GFP é estável, independente de espécies e pode ser monitorada não invasivamente em células vivas (KAIN *et al.*, 1995).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

- Azul de Tripán – Cellgro® (Mediatech, Inc. Herndon, VA, EUA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) - ATCC (Manassas, VA, EUA).
- Garrafas para cultivo celular de 25 e 75 cm<sup>2</sup> - Corning Costar (Lowell, MA, EUA)
- Linhagem de células humanas de carcinoma de próstata - LNCaP, CRL-1740, ATCC (Manassas, VA, EUA).
- Lipofectamina™ 2000 - Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).
- Meio de cultura RPMI – 1640, ATCC (Manassas, VA, EUA).
- Membranas de policarbonato HTPP – 0,4 µm e GTTP – 0,2 µm - Millipore (Billerica, MA, EUA).
- Opti-MEM® I - Invitrogen – (Carlsbad, CA, EUA)
- Pipetas de plástico graduada estéreis, Techno Plastic Products AG – TPP (Trasadingen, Suíça)
- Placas de cultivo celular com poços, Techno Plastic Products AG – TPP (Trasadingen, Suíça)
- Reagente MTT 3-[[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Brometo de Difeniltetrazolio} - Sigma (Saint Louis, M, EUA)
- Solução antibacteriana-antifúngica (Penicilina + estreptomicina + anfotericina) - Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)
- Solução de tripsina-EDTA - 0,25% (p/v) - ATCC (Manassas, VA, EUA)
- Soro Fetal Bovino - Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Tubos Eppendorf estéreis (Hamburg, Alemanha)
- Tubos Falcon estéreis, Techno Plastic Products AG – TPP (Trasadingen, Suíça).

## **2.2 Cultivo das células LNCaP**

### **2.2.1 Descongelamento das células**

As células LNCaP foram descongeladas em banho-maria a 37 °C (Fanem - MOD 100, São Paulo, Brasil) e, em seguida, todo o material foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 9,0 mL de meio de cultura completo (MCC), composto de RPMI 1640 adicionados de 1% de solução antibacteriana-antifúngica e de 10% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão celular foi centrifugada (Fanem – São Paulo, Brasil) à 125 x g por 5 min, à temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi disperso em uma alíquota de 5,0 mL de MCC e, logo em seguida, a suspensão foi transferida para uma garrafa de cultivo T-25 contendo 5 mL de MCC. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi utilizada para contagem e avaliação da viabilidade celular com solução de azul de tripan. A garrafa foi incubada por 48 h em estufa (Forma Scientific – Marietta, EUA) regulada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir a aderência das células. Após este período, o MCC da garrafa foi substituído por 7 mL de MCC fresco e as células foram incubadas até atingirem 75% de confluência. Durante o período de crescimento, o MCC da garrafa foi substituído por MCC fresco a cada 2 ou 3 dias.

### **2.2.2 Subcultivo das células**

O subcultivo das células LNCaP foi realizado em garrafas T-25 ou T-75 a partir de cultura celular com pelo menos 75% de confluência. Inicialmente, o MCC das garrafas foi removido e volumes apropriados de solução de tripsina- EDTA 0,25% (p/v) foram adicionados aos frascos: 1,0 mL para T-25 e 2,0 mL para T-75. As garrafas foram deixadas em repouso por 3 a 5 minutos para permitir o descolamento das células. Posteriormente, alíquotas de 6,0 e de 8,0 mL de MCC foram adicionados às garrafas T-25 e T-75, respectivamente e os grumos celulares foram dispersos com auxílio de pipeta, por movimentos repetidos de sucção e descarte.

Em seguida, as células suspensas em MCC foram transferidas das garrafas para tubos falcon de 15 mL, os quais foram submetidos à centrifugação por 5 minutos à 125 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, um volume de 5 mL de MCC foi adicionado aos tubos e os *pellets* foram dispersos com auxílio de pipeta, por movimentos repetidos de sucção e descarte, até formação de uma suspensão celular homogênea. Finalmente, o número de células viáveis por mL de suspensão foi determinado pelo método de exclusão com solução de azul de tripan, utilizando um hemacitômetro. O valor da viabilidade celular foi utilizado para calcular o volume de suspensão a ser diluído em MCC, de modo que o número inicial de células nas novas garrafas ficasse em torno de  $2 \times 10^5$  e de  $7 \times 10^5$  células/mL para as garrafas T25 e T75, respectivamente.

### **2.2.3 Congelamento das células**

O congelamento de células LNCaP foi realizado a partir de culturas com 75% de confluência. Inicialmente foi preparada uma suspensão celular, que foi realizada conforme descrito no item 2.2.2 deste capítulo, até à etapa de determinação do número de células na suspensão. Em seguida, a suspensão de células foi diluída em MCC de modo a se obter um número de células igual a  $3 - 8 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, 500  $\mu$ L desta suspensão foram transferidos para criotubos de 1,2 mL, nos quais foram adicionados 500  $\mu$ L da mistura de congelamento (MCC:SFB:DMSO na proporção 2:2:1, respectivamente). Finalmente, a suspensão celular foi delicadamente homogeneizada com pipeta e procedeu-se ao congelamento das células obedecendo as seguintes etapas: os tubos foram, inicialmente, colocados por 2 horas em freezer a  $-20$  °C, em seguida, permaneceram pernoite em freezer a  $-80$  °C para, posteriormente, serem transferidos para o container de nitrogênio líquido.

### 2.3 Avaliação da citotoxicidade dos LpAct

A avaliação *in vitro* da toxicidade dos LpAct nas células LNCaP foi realizada utilizando o reagente MTT. O procedimento para a reação de redução do MTT foi elaborado baseado no protocolo do fornecedor e empregou os seguintes reagentes: solução de MTT estoque (5,0 mg/mL em tampão fosfato-salino (PBS) 1X); solução de MTT diluída (0,5 mg/mL em MCC) – ambas estéreis; solução de lauril sulfato de sódio a 1,0% (p/v) em HCl M/100 - recém-preparada.

O teste foi realizado em placa de 96 poços e foram avaliados os seguintes tempos de contato: 4, 24 e 48 horas (1 placa por tempo). Em cada placa foram separados grupos de poços destinados à amostra-controle (células que não foram expostas ao contato com lipossomas); à amostra-teste (células que receberam tratamento com lipossomas) e à amostra-branco (poços sem células que receberam apenas os reagentes da reação de MTT).

Os LpAct foram produzidos conforme procedimento descrito no Capítulo 1 item 2.5, com a concentração total de lípides de 10 mM. O volume dos reagentes utilizados para a preparação de 1,0 mL dos LpAct foram os seguintes: para a formação do filme lipídico foram utilizadas alíquotas de 0,4 mL de cada uma das soluções em clorofórmio dos fosfolípidos (DOPE 0,030 mmol/mL e CHEMS 0,020 mmol/mL). O volume de NaOH 0,1M utilizado para ionização do CHEMS foi de 0,080 mL. Para a obtenção da emulsão A/O foram utilizados 1,0 mL da solução do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct (30  $\mu$ g/mL) em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4. As condições para a evaporação do éter etílico e produção dos lipossomas foram as seguintes: inicialmente, um vácuo com intensidade de 300 mbar por 2 horas e, em seguida, de 100 mbar por 1 hora e uma velocidade de rotação igual a 120 rpm. Após o preparo, os lipossomas foram extrusados e purificados conforme descrito nas partes 3 e 4 do item 2.5 do Capítulo 1. O teor de pAct encapsulado nos LpAct foi determinado conforme descrito no Capítulo 1, item 2.8.

Estes lipossomas, com teor de pAct encapsulado igual a 32,4  $\mu$ g/mL, foram previamente filtrados em membrana de policarbonato de 0,2  $\mu$ m para obtenção de

uma preparação estéril. Posteriormente, os LpAct foram diluídos em MCC de modo a obter amostras com concentrações de pAct iguais a 6,5; 3,2; 1,3; e 0,65 µg/mL.

O volume da suspensão de células LNCaP semeado nos poços foi de 150 µL ( $1,4 \times 10^4$  células por poço) e as células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 70% de confluência. No momento do teste, o meio de cultura foi removido dos poços e 100 µL de cada amostra de LpAct foram adicionados aos respectivos poços (n=8 para cada concentração). Nos poços da amostra-controle (n=8) o meio de cultura foi substituído por MCC fresco. Cada placa foi incubada no seu respectivo tempo de contato na mesma condição de cultivo citada acima. Após este tempo, o meio foi removido dos poços das amostras-controle e teste e 100 µL da solução diluída de MTT foram adicionados nesses poços, e em mais oito novos, para produzir a amostra-branco. A placa foi envolvida com papel alumínio e incubada por 2 horas na condição de cultivo. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 100 µL da solução de lauril sulfato de sódio a 1% (p/v) e a placa, envolvida com papel alumínio, foi novamente incubada pernoite, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, foi feita a leitura das amostras no leitor automático de placas Microplate Spectrophotometer – Benchmark Plus™ (Biorad, Califórnia, EUA), no modo duplo e nos comprimentos de onda de 570 nm (filtro de leitura) e 690 nm (filtro de referência). Para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular (PVC) todas as leituras relativas à amostra-controle e à amostra-teste foram, previamente, subtraídas do valor médio das leituras da amostra-branco.

Para o cálculo da PVC foi empregada a seguinte equação:

$$\text{PVC (\%)} = \frac{\text{média das leituras dos poços da amostra - teste}}{\text{média das leituras dos poços da amostra - controle}} \times 100$$

## 2.4 Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP

O método utilizado para avaliar a capacidade de transfecção dos lipossomas contendo o complexo ciclodextrina catiônica/DNA plasmidial nas células LNCaP foi o

da determinação do número de células positivas que apresentaram a expressão da proteína EGFP (*enhanced green florescent protein*). O plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, EUA), contendo o gene capaz de expressar a EGFP, foi doado gentilmente pelo Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes (Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais) e utilizado na preparação dos lipossomas.

Para este estudo foram preparados os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pEGFP (LpEGFP). Estes lipossomas compostos de DOPE/CHEMS na razão molar 6/4, respectivamente, foram preparados com a concentração lipídica total de 10 mM.

A solução contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pEGFP, a ser encapsulada nos lipossomas, foi preparada com a razão de carga CD<sup>+</sup>/DNA igual a <sup>+</sup>1/1 e concentração de pEGFP igual a 30  $\mu$ g/mL. O modo de preparo foi igual ao descrito no Capítulo 1, item 2.4.3 e as concentrações de Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup> e de pEGFP-N1 na solução do complexo foram iguais a 0,11 mg/mL e 30  $\mu$ g/mL, respectivamente.

Os lipossomas LpEGFP foram produzidos pelo método REV como relatado no item 2.5 do Capítulo 1. O volume dos reagentes utilizados para a preparação de 1,0 mL desses lipossomas foram os seguintes: para a formação do filme lipídico foram utilizadas alíquotas de 0,4 mL de cada uma das soluções em clorofórmio dos fosfolípides (DOPE 0,030 mmol/mL e CHEMS 0,020 mmol/mL). O volume de NaOH 0,1M utilizado para ionização do CHEMS foi de 0,080 mL. Para a obtenção da emulsão A/O foram utilizados 1,0 mL da solução do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pEGFP em tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4. As condições para a evaporação do éter etílico e produção dos lipossomas foram as seguintes: inicialmente, um vácuo com intensidade de 300 mbar por 2 horas e, em seguida, de 100 mbar por 1 hora e uma velocidade de rotação igual a 120 rpm. Após a obtenção, os lipossomas foram extrusados e purificados conforme descrito nas partes 3 e 4 do item 2.5 do Capítulo 1. Os LpEGFP foram filtrados em membrana de policarbonato de 0,2  $\mu$ m para obtenção de uma preparação estéril. No momento do teste, os LpEGFP foram diluídos no meio de transfecção nas concentrações de pEGFP iguais a 6,0; 3,0; 1,2 e 0,60  $\mu$ g/mL.

A expressão de EGFP foi avaliada em dois experimentos. No primeiro (Experimento A) o objetivo principal foi verificar a eficácia de transfecção do sistema em relação à concentração de DNA e ao tempo de transfecção. Neste caso, a condição de transfecção dos LpEGFP foi realizada em presença de SFB (10%), para todas as amostras. No segundo (Experimento B), o foco foi verificar o efeito do SFB sobre a eficiência de transfecção dos LpEGFP nas células LNCaP. Na **Tabela 3.1** está descrito o planejamento dos experimentos A e B com relação ao tempo de transfecção, à quantidade de DNA por poço e os meios de transfecção utilizados.

**Tabela 3.1 - Planejamento dos Experimentos A e B para avaliação da expressão de EGFP a partir da incubação dos LpEGFP nas células LNCaP.**

| Expressão de EGFP                        | Tempo de transfecção (h)                  | Amostras | Quantidade de DNA/poço ( $\mu\text{g}$ ) | Meio de transfecção |     |        |
|--|---|----------|--|---------------------|-----|--------|
| <b>Experimento A</b><br>Placa de 6 poços | 4   | 1        | 12,00                                    | 10% SFB             |     |        |
|  |   | 2        | 6,00                                     |                     |     |        |
|  |   | 3        | 2,40                                     |                     |     |        |
|  |   | 4        | 1,20                                     |                     |     |        |
|  | 24  | 1        | 12,00                                    |                     |     |        |
|  |   | 2        | 6,00                                     |                     |     |        |
|  |   | 3        | 2,40                                     |                     |     |        |
|  |   | 4        | 1,20                                     |                     |     |        |
|  | 48  | 1        | 2,40                                     |                     |     |        |
|  |   | 2        | 1,20                                     |                     |     |        |
|  | <b>Experimento B</b><br>Placa de 12 poços | 6        | 1  |                     | 1,2 | 0% SFB |
|  |   |          | 2  |                     |     | 5% SFB |
| 3  |   |          | 10% SFB                                  |                     |     |        |
| 4  |   |          | opti-MEM <sup>®</sup> I                  |                     |     |        |
| 24                                       |   | 1        | 0,6                                      | 5% SFB              |     |        |
|  |   | 2        |  | 10% SFB             |     |        |
| 48                                       |   | 1        | 0,6                                      | 5% SFB              |     |        |
|  |   | 2        |  | 10% SFB             |     |        |

Nos experimentos A e B, o reagente Lipofectamina™ 2000 foi utilizado como controle positivo de transfecção e os lipossomas pH-sensíveis brancos (sem DNA) como controle negativo. O reagente Lipofectamina™ 2000 foi preparado no meio

Opti-MEM<sup>®</sup>I conforme protocolo do fornecedor. A concentração final de pEGFP-N1 e de Lipofectamina<sup>™</sup> 2000 no complexo foi de 0,0135 e 0,05 µg/µL, respectivamente. Os lipossomas brancos foram produzidos como descrito anteriormente para os LpEGFP, com exceção na etapa da obtenção da emulsão A/O, na qual foi adicionado 1,0 mL do tampão Tris-NaCl 50 mM pH 7,4, e não a solução do complexo Am-β-CD<sup>+</sup>/pEGFP. Após o preparo, estes lipossomas foram diluídos 10 vezes em MCC.

A avaliação da expressão da EGFP no experimento A foi realizada em placas de seis poços. O volume semeado da suspensão de células LNCaP em cada poço foi de 2,0 mL ( $3,7 \times 10^5$  células por poço) e as células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 70% de confluência. As amostras de lipossomas nas concentrações de pEGFP iguais a 6,0; 3,0; 1,2 e 0,60 µg/mL foram preparadas a partir da diluição dos lipossomas LpEGFP em MCC. No momento da transfecção, o MCC dos poços foi removido e 2,0 mL de cada amostra de lipossomas foram adicionados aos respectivos poços (n = 3). Para cada tempo avaliado foram realizados o controle positivo e o negativo de transfecção. No caso da Lipofectamina<sup>™</sup> foram adicionados ao poço 100 µL do complexo (1,35 µg DNA) e 1,9 mL de MCC. Em relação aos lipossomas brancos, foram adicionados 2,0 mL da amostra diluída em MCC. Após a adição das amostras de lipossomas em MCC, as placas foram incubadas nas condições de cultivo durante os tempos de transfecção descritos na **Tabela 3.1**. Após cada período, o meio de cultura contendo o sistema de transfecção foi substituído por MCC fresco e as placas foram novamente incubadas, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, até o momento de serem examinadas ao microscópio de fluorescência para verificação da expressão da EGFP. As amostras que foram expostas a um tempo de transfecção de 48 h foram examinadas logo após atingir este tempo. No caso das amostras transfectadas por 4 e 24 h, a expressão da EGFP foi verificada após um período de incubação de 30 h. O microscópio de fluorescência utilizado foi o IX70 da Olympus, acoplado com câmera digital E-300, Zuiko Digital kit (Olympus). Os filtros para a observação da EGFP foram os correspondentes aos comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 520 nm.

---

No experimento B a avaliação da expressão da EGFP nas células LNCaP foi realizada em placas de doze poços. Em cada poço foi semeado 1,0 mL ( $2,0 \times 10^5$  células por poço) da suspensão de células em MCC. As placas foram incubadas 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até as células atingirem 70% de confluência. Para a preparação das amostras, os LpEGFP foram diluídos nos diferentes meios de transfecção descritos na **Tabela 3.1** nas concentrações de pEGFP iguais a 1,2 e 0,6 µg/mL. No momento da transfecção, o MCC dos poços foi removido e 1,0 mL de cada amostra de lipossomas foi adicionado aos respectivos poços (n = 2). Como descrito no Experimento A, foram também realizados o controle positivo e o negativo de transfecção. Após a adição das amostras de LpEGFP, as placas foram incubadas nas condições de cultivo durante os tempos de transfecção descritos na Tabela 1. Após cada período, o meio de cultura contendo o sistema de transfecção foi substituído por MCC fresco e as placas foram novamente incubadas, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, até o momento de serem examinadas ao microscópio de fluorescência para verificação da expressão da EGFP. As amostras que foram expostas a um tempo de transfecção de 48 h foram examinadas logo após atingir este tempo. No caso das amostras transfectadas por 6 e 24 h, a expressão da EGPF foi verificada após um período de incubação de 30 h.

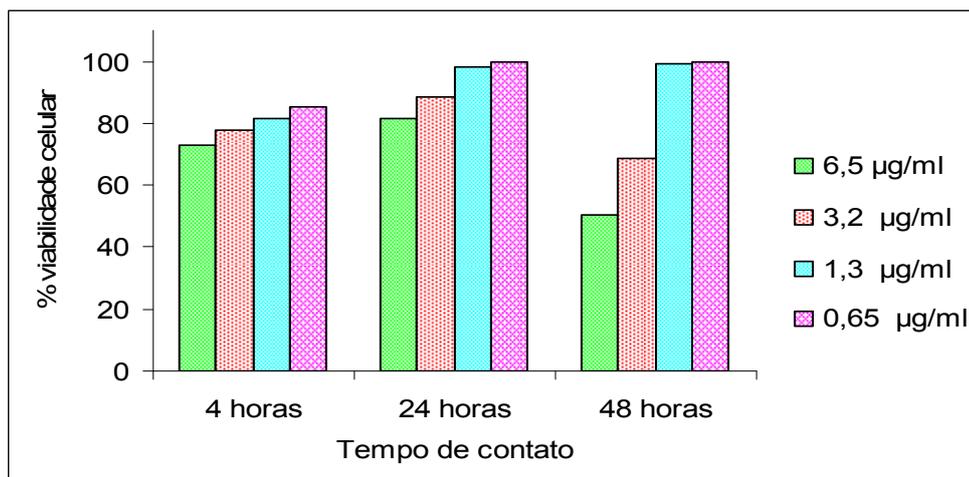
### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação da citotoxicidade dos LpAct

Segundo Hung e colaboradores (2005), após o tratamento das células com o agente de transfecção, a PVC deve estar entre 70% a 80% para que o uso deste agente seja considerado seguro.

Na **Figura 3.1** estão apresentados os resultados do PVC das amostras de LNCaP tratadas com diferentes concentrações de pAct. Para o tempo de contato de 4 horas, os PVC foram os seguintes: 73,2% (6,5  $\mu\text{g/mL}$ ), 77,8% (3,2  $\mu\text{g/mL}$ ); 81,4% (1,3  $\mu\text{g/mL}$ ) e 85,4% (0,65  $\mu\text{g/mL}$ ). Com base nestes resultados, todas as amostras podem ser usadas em ensaios de transfecção, pois, para todas elas, a PVC foi superior a 70%. Tavares (2006) encontrou resultados similares após incubação de lipossomas de mesma constituição lipídica contendo o DNA plasmidial pGEM-T em células CHO. Considerando que nos ensaios de transfecção, a quantidade de DNA presente por poço de células varia em torno de 0,5 a 1,5  $\mu\text{g}$ , pode-se constatar que os LpAct podem ser aplicados na quantidade necessária à avaliação de sua capacidade de transfecção sem induzir citotoxicidade (ESCRIOU *et al*, 1998; ZUIDAN *et al*, 1999; HYVÖNEN *et al*, 2004; ; NGUYEN *et al.*, 2007; MIGNET *et. al*, 2008).



**Figura 3.1** - Efeito citotóxico dos LpAct nas concentrações de pAct iguais a 6,5, 3,2, 1,3 e 0,65 µg/mL em MCC. As determinações foram realizadas após o período de incubação de 4, 24 e 48 horas. O crescimento celular foi determinado por intermédio do teste MTT. Os resultados expressam a média de 8 amostras.

No estudo de citotoxicidade, a influência do tempo de contato de LpAct com as células LNCaP foi, também, investigada com o objetivo de se avaliar, posteriormente, o impacto sobre a resposta de transfecção. Além do tempo de 4 horas, foram também avaliados os intervalos de 24 e 48 horas.

Para o tempo de contato de 24 horas, a PVC foi a seguinte: 81,8% (6,5 µg/mL de pAct), 88,7% (3,2 µg/mL de pAct), 98,0% (1,3 µg/mL de pAct) e 100% (0,65 µg/mL de pAct). Neste caso, um aumento da PVC em relação ao intervalo de tempo de 4 horas foi observado para todas as diluições de LpAct analisadas. Estes resultados sugerem que o tempo de 24 horas é suficiente para compensar o certo grau de morte celular observado no tempo de 4 horas. Com base nestes resultados todas as diluições de LpAct investigadas podem ser utilizadas por um tempo de transfecção de 24 horas.

Após 48 horas de contato com as células LNCaP, os LpAct com concentração de pAct de 6,5 e 3,2 µg/mL tiveram uma PVC de 50,7 e 68,7%, respectivamente. Em contrapartida, as amostras com concentração de pAct iguais a 1,3 µg/mL e 0,65 µg/mL mantiveram um crescimento celular o que gerou uma PVC de 99,2 e 100,0%, respectivamente. Diante destes resultados, para um tempo de transfecção de 48

horas, apenas as amostras de LpAct com concentrações de pAct iguais a 1,3 µg/mL e 0,65 µg/mL poderão ser utilizadas.

Ainda com relação ao teste de citotoxicidade, vale ressaltar que durante o experimento os grupos de células controle tiveram um crescimento de aproximadamente 40% entre o tempo de incubação inicial de 4 horas e o tempo final de 48 horas. Este fato indica que a condução do experimento foi adequada em relação ao número de células semeado por poço, ao tempo de duração do teste e às condições de cultivo.

### 3.2 Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP

O número total de células LNCaP que expressou a proteína EGFP, após transfecção com os LpEGFP, está descrito na **Tabela 3.2**.

**Tabela 3.2 - Avaliação da expressão da proteína EGFP nas células LNCaP transfectadas com os LpEGFP**

| Experimentos  | A  |      |      | B             |               |                |            |               |                |               |                |
|---------------|--|------|------|---------------|---------------|----------------|------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
|               | RPMI + 10% SFB   |      |      | RPMI + 0% SFB | RPMI + 5% SFB | RPMI + 10% SFB | opt-MEM® I | RPMI + 5% SFB | RPMI + 10% SFB | RPMI + 5% SFB | RPMI + 10% SFB |
| pEGFP (µg/mL) | Número total de células positivas para EGFP por tempo de transfecção |      |      |               |               |                |            |               |                |               |                |
|               | 4 h  | 24 h | 48 h | 6 h           |               |                |            | 24 h          |                | 48 h          |                |
| 6,0           | 1  | 2    |      |               |               |                |            |               |                |               |                |
| 3,0           | 1  | 3    |      |               |               |                |            |               |                |               |                |
| 1,2           | 1  | 4    | 1    | 3             | 3             | 6              | 8          |               |                |               |                |
| 0,6           | 1  | 2    | 5    |               |               |                |            | 1             | 1              | 5             | 8              |

Com relação ao experimento A, em que o processo de transfecção ocorreu na presença de 10% de SFB, a expressão de EGFP no tempo de transfecção de 4 horas teve uma resposta semelhante em todas as concentrações de DNA testadas. Nesta condição experimental, as quantidades de DNA testadas por poço foram de 12,0, 6,0, 2,4 e 1,2 µg, ou seja, contemplaram o que é sugerido na literatura. Nos trabalhos de Legendre e Szoka (1992), lipossomas pH-sensíveis compostos de DOPE/CHEMS (na razão molar 2/1) e contendo o plasmídeo pCluc4 foram capazes de transfectar as células CV-1. A eficiência de transfecção foi avaliada em termos da atividade da enzima luciferase expressa nas células, após um período de contato de 5 horas. As células foram transfectadas com os lipossomas contendo uma quantidade de DNA encapsulada que variou de 0,5 a 4,0 µg/poço, sendo que a melhor resposta foi com 2,0 µg.

Segundo Legendre e Szoka (1992), os lipossomas aniônicos pH-sensíveis, por terem uma carga superficial negativa são passíveis de sofrerem uma captação celular mais lenta e gradual quando comparados com os lipossomas catiônicos. No caso dos lipossomas catiônicos, a existência de forte atração eletrostática entre sua carga positiva e a carga negativa da membrana celular, favorece sua rápida associação com as células e, conseqüentemente, sua entrada no compartimento celular. Para o complexo lipofectamina/DNA, por exemplo, essa associação pode ser de 3% da dose em trinta minutos. Diante disto, como não há dados na literatura sobre transfecção das células LNCaP com lipossomas pH-sensíveis compostos de DOPE/CHEMS (razão molar igual a 6/4, respectivamente), os tempos de 24 e 48 horas foram avaliados com o objetivo de investigar se o período de contato dos LpEGFP com as células é um fator determinante no processo de transfecção.

Os valores de células que expressaram EGFP nos tempos de 24 e 48 horas (Tabela 3 – Experimento A) foi maior do que o observado em 4 horas de transfecção, nas diferentes concentrações de DNA testadas. Este resultado nos permite sugerir que a transfecção das células LNCaP intermediada pelos LpEGFP pode ser influenciada pelo tempo de contato do sistema com as células e que um tempo de transfecção superior a 4 horas pode favorecer a captação dos lipossomas pelas células LNCaP e, portanto, a expressão da EGFP. Além disto, quando a interação entre o sistema de transfecção e a célula é forte, a troca de meio de cultura não é capaz de retirar os

lipossomas da superfície celular, o que permite que os mesmos sejam continuamente internalizados para dentro da célula. Em nosso estudo, a probabilidade de baixa interação entre os lipossomas LpEGFP e as células LNCaP pode ter ocorrido, o que explicaria os resultados inferiores de expressão de EGFP no tempo de contato de 4 horas, quando comparado com os tempos de 24 e 48 (**Tabela 3.2** – Experimento A).

Os lipossomas pH-sensíveis possuem lípides na sua formulação que são capazes de se fundirem com a membrana citoplasmática e endossomal, após sua internalização via endocitose. É sabido que após a formação do endossoma, ocorre uma redução do pH, que pode levar à protonação do agente estabilizante CHEMS, presente na membrana dos lipossomas pH-sensíveis, e conseqüentemente, à formação de uma organização hexagonal das moléculas de DOPE, seguida de fusão destas moléculas com a membrana endossomal e liberação do conteúdo encapsulado para o citoplasma.

No entanto, na prática, a extensão com que estes sistemas se ligam à superfície celular, para dar início ao processo acima mencionado, depende não só das condições experimentais, mas também de características inerentes a cada tipo de linhagem celular. Legendre e Szoka (1992) avaliaram a capacidade de transfecção dos lipossomas compostos de DOPE/CHEMS (razão molar igual a 2/1, respectivamente) para transfectar diferentes linhagens de células de mamíferos. O sistema transfectou as células CV-1; HepG2; HeLa e p388D1, mas não foi capaz de transfectar as células KD83.

Considerando o baixo nível de transfecção observado no experimento A, realizado totalmente na presença de 10% de SFB, avaliar outras composições de meio de transfecção foi a conduta adotada para investigar se a capacidade de transfecção dos LpEGFP nas células LNCaP é afetada pela presença de SFB. A opção de trabalhar apenas com as diluições de lipossomas com concentrações de DNA de 1,2 e 0,6 µg/mL baseiou-se nos valores obtidos de PVC igual a 90% para estas preparações. Como pode ser visto na **Tabela 3.2** – Experimento B, o número de células que expressaram a EGFP com os meios de transfecção RPMI, com e sem SFB ou opt-MEM<sup>®</sup> I foi semelhante em todas as condições experimentais. Este

---

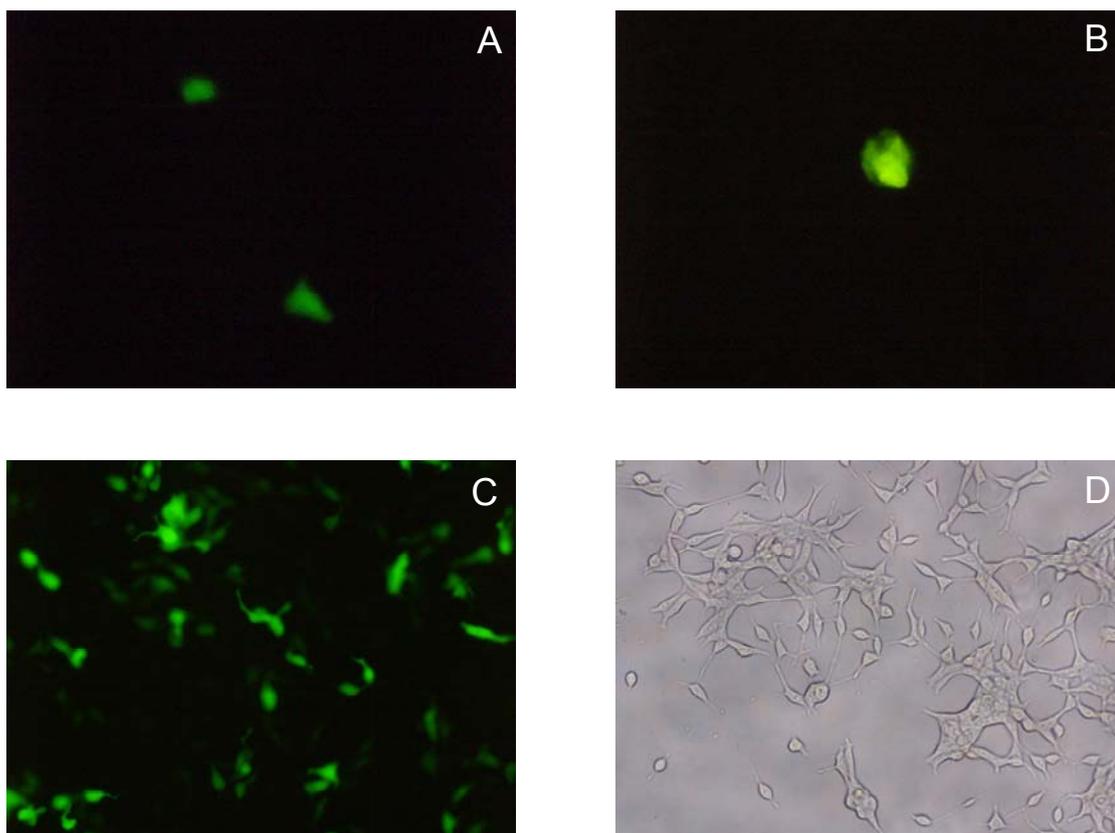
resultado sugere que a presença do SFB não é o fator determinante para a transfecção celular nos diferentes intervalos avaliados.

No caso dos lipossomas pH-sensíveis, a influência do SFB na capacidade de transfecção desses sistemas não é tão bem demonstrada na literatura como é para os lipossomas catiônicos. No trabalho de Legendre e Szoka (1992), lipossomas compostos de DOPE/CHEMS (razão molar igual a 2/1, respectivamente) apresentaram, também, resultados de transfecção semelhantes nas células CV-1 e HepG2 na ausência e na presença de 10% de SFB. Entretanto, nos estudos de Shi e colaboradores (2002), os lipossomas compostos de DOPE/CHEMS/f-PEG-PE (razão molar igual a 60/40/0,1, respectivamente) tiveram sua capacidade de transfecção em células KB significativamente reduzida na presença de 10% de SFB. Segundo estes autores, uma das limitações dos lipossomas pH-sensíveis contendo DOPE é a perda da propriedade fusogênica deste lípide em meio ácido, possivelmente, devido à interações entre as moléculas de DOPE e as opsoninas presentes no soro.

Até o presente momento, o resultado de baixo nível de expressão da proteína EGFP foi discutido levando em consideração fatores que poderiam ter interferido na capacidade dos LpEGFP transporem a membrana celular. Além do que já foi mencionado anteriormente, pode-se supor que a adoção de estratégia que aumente a interação da superfície lipossomal com a membrana plasmática possa conduzir a um maior grau de transfecção. Segundo Chu e colaboradores (1990) e Simões e colaboradores (2001) a captação celular dos lipossomas pH-sensíveis pode ser otimizada quando na sua superfície são adicionadas moléculas capazes de se ligarem, de forma específica, à receptores presentes na membrana celular. A endocitose mediada por receptor é mais eficiente, pois a interação entre a molécula ligante e o receptor celular facilita a aproximação da membrana lipossomal com a plasmática, promovendo assim, a fusão das duas. Shi e colaboradores (2002) obtiveram resultados eficientes de transfecção em células KB em presença de 10% de SFB, utilizando lipossomas que apresentavam um ligante específico para receptor de folato, com a seguinte composição: DDAB/CHEMS/f-PEG-PE (razão molar igual a 60/40/0,1, respectivamente).

Outras possíveis causas das dificuldades dos LpEGFP em promoverem o escape do material encapsulado do endossoma e liberar o plasmídeo pEGFP no citosol serão agora analisadas com base nas informações obtidas do estudo estrutural dos lipossomas pH-sensíveis por EDXD (SILVA *et al.*, 2011). A análise do padrão de difração dos lipossomas LpAct revelou que o complexo Am- $\beta$ -CD+/pAct interagiu com a membrana celular, conduzindo à um arranjo supramolecular da DOPE diferente daquele observado nos lipossomas brancos. Apesar dos estudos EDXD em pH ácido (tampão Tris e MCC) sugerir que a interação do complexo com a bicamada lipídica não impediu a ocorrência de transição de fase da DOPE de lamelar para hexagonal, não podemos descartar a hipótese de que a pH-sensibilidade dos LpEGFP, no meio celular, não tenha sido prejudicada pela interação existente entre o complexo Am- $\beta$ -CD+/pEGFP e a membrana lipídica. Outro aspecto importante a considerar é a dissociação do complexo Am- $\beta$ -CD+/pEGFP após sua liberação no meio citoplasmático. Se fatores como a resposta dos LpEGFP à variação ao pH ou a força das interações moleculares entre Am- $\beta$ -CD+ e pEGFP prejudicarem a liberação do plasmídeo pEGFP e, conseqüentemente, sua transferência para o núcleo, haverá uma expressão não significativa do transgene.

Na **Figura 3.2** estão representados a detecção da proteína EGFP após sua expressão mediada por LpEGFP ou Lipofectamina associada a EGFP. Com relação ao controle negativo do experimento, vale ressaltar que nas células transfectadas com os lipossomas pH-sensíveis brancos não foram observados sinais de fluorescência.



**Figura 3.2** – Fotomicrografias da expressão de EGFP em células LNCaP. As células foram transfectadas com LpEGFP em meio RPMI com 10% SFB (A) e com 5% SFB (B) ou com o reagente Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 associado ao pEGFP em meio opt-MEM<sup>®</sup> I (C). Nas imagens A, B e C as células foram examinadas por microscopia de fluorescência e em D por microscopia de contraste de fase. A ampliação de todas as fotomicrografias foi com a objetiva de 20x.

## **4 CONCLUSÕES**

## 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, os LpAct se mostraram capazes de transfectar a linhagem celular LNCaP, mas com uma baixa eficiência, nas condições de transfecção utilizadas. Este estudo, no entanto, é importante para direcionar futuras investigações que venham esclarecer qual(is) etapa(s) do processo de transfecção que possa(m) ter apresentado limitações ao emprego dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD+/pAct como agente de transfecção. Dentre as propostas de investigações para elucidar a resposta de transfecção obtida pode-se destacar:

1. Avaliação do nível de transfecção em outras linhagens celulares, a fim de se determinar se o resultado de baixa transfecção intermediada pelos lipossomas LpEGFP é uma resposta específica em relação às células LNCaP.
2. A inclusão de moléculas na superfície das vesículas, capazes de direcionar e intermediar a endocitose via receptor sítio-específico, uma vez que a endocitose é o mecanismo mais provável de entrada destes sistemas no compartimento celular.
3. A complexação das moléculas de plasmídeo com moléculas da ciclodextrina catiônica (Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>) é um recurso que facilita a encapsulação de DNA nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis. No entanto, faz-se necessário investigar se as interações entre o complexo Am- $\beta$ -CD+/DNA com a membrana lipossomal afeta a pH-sensibilidade do sistema no citosol e, ainda, avaliar a extensão da dissociação do complexo Am- $\beta$ -CD+/DNA presente no citoplasma e a entrada do DNA no compartimento nuclear para que ocorra a expressão gênica. Portanto, estudos para avaliação do tráfego intracelular dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD+/DNA se fazem necessários para a compreensão de sua eficiência como agentes de transfecção.

Embora neste estudo preliminar, tenha sido demonstrada a limitação dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD+/pAct como carreador de genes, vale ressaltar que a utilização destes sistemas na terapia gênica não deve

ser descartada, pois os mesmos possuem características importantes, tais como: baixa toxicidade celular, facilidade de encapsular o DNA, boa estabilidade e fácil preparo.

**CONCLUSÕES FINAIS**

---

## CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados dos estudos realizados nesta tese de doutorado nos permite concluir que:

- A utilização do experimento fatorial permitiu estabelecer as condições ótimas para a produção dos LpAct. As condições experimentais que conduziram à encapsulação otimizada do complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct nos lipossomas foram: velocidade de rotação de 120 rpm, intensidade de vácuo de 300 mbar, concentração lipídica total de 10 mM e concentração do plasmídeo pAct igual a 30  $\mu$ g/mL.
- O estudo da organização supramolecular das moléculas de DOPE por intermédio da EDXD permitiu constatar que o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct interage com a membrana lipídica dos lipossomas resultando nas presenças de fases lamelar e hexagonal em pH-fisiológico.
- Apesar das interações entre o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct e os lípides foi possível identificar a presença da fase hexagonal das moléculas da DOPE, o que sugere que a pH-sensibilidade dos LpAct não tenha sido alterada.
- As moléculas da DOPE formam estruturas menos organizadas na presença das proteínas do SFB, tanto em pH 7,4 quanto em 5,0, sugerindo a existência de interação entre estes e os lípides da bicamada lipídica.
- Os LpEGFP se mostraram capazes de transfectar a linhagem celular LNCaP, mas com uma baixa eficiência, nas condições de transfecção utilizadas. O tempo de transfecção, a quantidade de DNA presente no poço de células e a presença de SFB no meio de transfecção parecem não ter sido os fatores limitantes do processo de expressão da EGFP intermediada pelos LpEGFP.

**PERSPECTIVAS**

## PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se propor algumas perspectivas, a saber:

- Avaliar a transfecção dos LpEGFP em outras linhagens celulares.
- Avaliar a inclusão de moléculas nas superfícies dos LpAct capazes de direccionar e intermediar a endocitose do sistema via receptor sítio-específico.
- Avaliar o tráfego intracelular dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo Am- $\beta$ -CD<sup>+</sup>/pAct.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENITSCH, H.; CARACCILO, G.; FOGLIA, P.; FUSCOLETTI, V.; GIANANTI, P.; MARIANECCI, C.; POZZI, D.; LAGANÀ, A. Existence of hybrid structures in cationic liposome / DNA complexes revealed by their interaction with plasma proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 141-146, 2011.

AL-DOSARI, M. S.; GAO, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations and recent progress. **The American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 4, p. 671-681, 2009.

ANWER, K.; RHEE, B. G.; MENDIRATTA, S. K. Recent progress in polymeric gene delivery systems. **Critical Review Therapeutic Drug Carrier System**, v. 20 (4), p. 249-293, 2003.

BATRES, Y.; ZHANG, Z.; YING, S. Y. Expression of activins and activin receptors messenger RNAs in LCNaP cells, a human prostatic adenocarcinoma cell line. **International Journal of Oncology**, v. 6, p. 1185-1188, 1995.

BELLAMY, W. T. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. **Drugs**, v. 15, n. 5, p. 690-708, 1992.

BILEZIKJIAN, L. M., BLOUNT, A. M., LEAL, A. M. O., DONALDSON, C. J., FISCHER, W. H., VALE, W. W. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.225, p. 29-36. 2004.

BODENTHIN, Y.; GRENZER, J.; LAUTER, R.; PIETSCH, U.; LEHMANN, P.; KURTH, D. G.; MÖHWAID, H. Temperature and time-resolved X-ray scattering at thin organic films. **Journal of Synchrotron Radiation**., v. 9, p. 206-209, 2002.

---

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

CARACCILOLO, G.; CALLIPO, L.; DE SANCTIS, S. C.; CAVALIERE, C.; POZZI, D.; LAGANÀ, A. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-CHOL-DOPE/DNA lipoplexes in serum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 536-543, 2010.

CARACCILOLO, G.; CAMINITI, R.; NATALI, F.; CASTELLANO, A. C. A new approach for the study of cationic lipid-DNA complexes by energy dispersive X-ray diffraction, **Chemical Physics Letters**, v. 366, p. 200-204, 2002.

CARACCILOLO, G.; POZZI, D.; CAMINITI, R.; CASTELLANO, C. Structural characterization of a new lipid/DNA complex showing a selective transfection efficiency in ovarian cancer cells. **The European Physical Journal E**, v.10, p.331 – 336, 2003.

CHEN, Y. G.,LUI, H. M., LIN, S. L., LEE, J. M., YING, S. Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis and carcinogenesis by activin. **Experimental. Biology and Medicine**, v. 227, n. 2, p. 75-87, 2002.

CHO, S. M.; LEE, H. Y.; KIM, J. C. pH-dependent release property of dioleoylphosphatidyl ethanolamine liposomes. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25 (2), p. 390-393, 2008.

CHU, C. J.; DIJKSTRA, J.; LAI, M. Z.; HONG, K.; SZOKA, C. Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in cultura. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 8, p. 824-834, 1990.

CONGIU, D.; POZZI, D.; ESPÓSITO, C.; CASTELLANO, C.; MOSSA, G. Correlation between structure and transfection efficiency: a study of DC-CHOL-DOPE/DNA complexes, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 36, p. 43-48, 2004.

---

CRYAN, S. A., HOLOHAN, A., DONOHUE, R., DARCY, R., O'DRISCOLL, C. M. Cell transfection with polycation cyclodextrin vectors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 625-633, 2004.

DA CRUZ, M. T. G.; SIMÕES, S.; PIRES, P. P. C.; NIR, S.; DE LIMA, M. C. P. Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex-cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1510, p. 136-151, 2001.

DALKIN, A. C.; GILRAIN, J. T.; BRADSHAW, D.; MYERS, C. E. Activin inhibition of prostate cancer cell growth: selective actions on androgen-responsive LNCaP cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5230-5235, 1996.

DELATTRE, J.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F.; PHILIPPOT, J-R.; SCHUBER, F. Les liposomes Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Les éditions INSERM & Editions Médicales Internationales, Paris, 1993, 260p.

DE OLIVEIRA, M. C.; FATTAL, E.; COUVREUR, P.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1372, p. 301-310, 1998.

DE OLIVEIRA, M. C.; ROSILIO, V.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. **Biophysical Chemistry**, v. 84, p. 127-137, 2000.

DOKKA, S.; TOLEDO, D.; Shi, S.; CASTRANOVA, V.; ROJANASAKUL, Y. Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 5, p. 521-525, 2000.

---

DÜZGÜNES, N.; FELGNER, P. I. Intracellular delivery of nucleic acids and transcription factors by cationic liposomes. **Methods Enzymology**, v.221, p. 303-306, 1993.

DÜZGÜNES, N.; SIMÕES, S.; SLEPUSHKIN, V.; PRETZER, E.; ROSSI, J. J.; DE CLERCQ, E.; ANTAO, V. P.; COLLINS, M. L.; LIMA, M. C. Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH-sensitive liposomes. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 20, p. 515-523, 2001.

EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, p. 833-842, 2007.

ESCRIOU, V.; CIOLINA, C.; HELBLING-LECLERC, A.; WILS, P.; SCHERMAN, D. Cationic lipid-mediated gene transfer: Analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, p. 95-104, 1998.

ESPOSITO, C.; GENEROSO, J.; MOSSA, G.; MASOTTI, A.; CASTELLANO, A. C. The analysis of serum effects on structure, size and toxicity of DDAB-DOPE and DC-CHOL-DOPE lipoplexes contributes to explain their different transfection efficiency. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 187-192, 2006.

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

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. “Smart” delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 931-946, 2004.

FELGNER, J. H., KUMAR, R., SRIDHAR, C. N., WHEELER, C. J., TSAI, Y. J., BORDER, R., RAMSEY, P., MARTIN, M., FELGNER, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2550-2561, 1994.

---

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

FERNANDES, C. M., VEIGA, F. J. B. As ciclodexinas na tecnologia farmacêutica. I Produção, Estrutura e Propriedades. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 20, p. 335-351, 1999.

FILLION, P.; DESJARDINS, A.; SAYASITH, K.; LAGACÉ, J. Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotídeos. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1515, p. 44-54, 2001.

FISCHER, D.; BIEBER, T.; LI, Y.; ELSÄSSER, H. P.; KISSEL, T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 8, p. 1273-1279, 1999.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro citotoxicidade assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

FRANCESANGELI, O.; PISANI, M.; STANIĆ, V.; BRUNI, P.; WEISS, T. M. Evidence of an inverted hexagonal phase in self-assembled phospholipids-DNA-metal complexes. **Europhysics Letters**, v. 67, n. 4, p. 669-675, 2004.

GAO, X.; HUANG, L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. **Biochemistry**, v. 35, p. 1027-1036, 1996.

GARCÍA, L.; BUÑUALES, M.; DÜZGÜNES, N.; ILARDUYA, C. T. Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 58-66, 2007.

---

Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em: <[www.abedia.com/wiley/years.php](http://www.abedia.com/wiley/years.php)>. Acesso em 11 de jul de 2011.

GODBEY, M.; MIKOS, A. G. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 115-125, 2001.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; BARROS, L. B.; PALMA, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, P. L.; RABASCO, A. M. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, p. 336-345, 2007.

HARRISON, C. A., GRAY, P. C., VALE, W. W., ROBERTSON, D. M. Antagonist of activin signaling: mechanism and potential biological applications. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 73-78, 2005.

HILLERY, A. M. Drug Delivery: The Basic Concepts. In: **Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. Taylor e Francis. 2001, p. 1-48.

HUNG, C. F.; HWANG, T. L.; CHANG, C. C.; FANG, J.Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 197-208, 2005.

HWANG, S. J., BELLOCQ, N. C., DAVIS, M. E. Effects of structure of  $\beta$ -Cyclodextrin-containing polymers on gene delivery. **Bioconjugate Chemistry**. v. 12, p. 280-290, 2001.

HYVÖNEN, Z.; RÖNKKÖ, S.; TOPPINEN, M. R.; JÄÄSKELÄINEN, I.; PLOTNIECE, A.; URTTI, A. Dioleoyl phosphatidylethanolamine and PEG-lipid conjugates modify DNA delivery mediated by 1,4-dihydropyridine amphiphiles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 177-190, 2004.

---

IGARASHI, S.; HATORRI, Y.; MAITANI, Y. Biosurfactante MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. **Journal of Controlled Release**, v. 112, p. 362-368, 2006.

ILARDUYA, C. T.; SUN, Y.; DÜZGÜNES, N. Gene delivery by lipoplex and polyplexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 159-170, 2010.

KAIN, S. R.; ADAMS, M.; KONDEPUDE, A.; YANG, T. T.; WARD, W. W.; KITTS P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. **Biotechniques**, v. 19, n. 4, p. 650-655, 1995.

KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; RÄDLER, J. O.; SAFINYA, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science**, v. 281, n. 5373, p. 78-81, 1998.

LAPPALAINEN, K., JÄÄSKELÄINEN, I., SYRJÄNEN, K., URTTI, A., SYRJÄNEN, S. Comparison of cell proliferation and toxicity assay using two cationic liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 8, p. 1127-1131, 1994.

LAVERMAN, P.; DAMS, E. T. M.; OYEN, W. J. G.; STORM, G.; KOENDERS, E. B.; PREVOST, R.; MEER, J. W. van der.; CORSTENS, F. H. M.; BOERMAN, O. C. A novel method to label liposomes with  $^{99m}\text{Tc}$  by the hydrazino nicotinyl derivative. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 40, n. 1, p. 192-197, 1999.

LEDLEY, F. D. Pharmaceutical Approach to somatic gene therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1595-1614, 1996.

LEGENDRE, J. Y.; SZOKA Jr., F. C. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 10, p. 1235-1242, 1992.

---

LEHTINEM, J.; HYVÖNEN, Z.; SUBRIZI, A.; BUNJES, H.; URTTI, A. Glycosaminoglycan-resistant and pH-sensitive lipid-coated DNA complexes produced by detergent removal method. **Journal of Controlled Release**, v. 131, p. 145-149, 2008.

Li, D.; LI, G.; LI, P.; ZHANG, L.; LIU, Z.; WANG, J.; WANG, E. The enhancement of transfection efficiency of cationic liposomes by didodecyldimethylammonium bromide coated gold nanoparticles. **Biomaterials**, v.31, p. 1850-1857, 2010.

LIU, F.; HUANG, L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 259-266, 2002.

MADY, M. M.; GHANNAM, M. M.; KHALIL, W. A.; REPP, R.; MARKUS, M.; RASCHER, W.; MÜLLER, R.; FAHR, A. Efficient gene delivery with serum into human cancer cells using targeted anionic liposomes. **Journal of Drug Targeting**, v. 12, n. 1, p. 11-18, 2004.

MAHATO, R. I.; TOMLINSON, E. Plasmid-based Gene Therapy. In: **Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. Taylor e Francis. 2001, p 372-396.

McTAGGART, S.; AL-RUBEAI, M. Retroviral vectors for humam gene delivery. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 1, p. 1-31, 2002.

MERDAN, T., KOPECEK, J., KISSEL, T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 715-758, 2002.

MIGNET, N.; RICHARD, C.; SEGUIN, J.; LARGEAU, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D. Anionic pH-sensitive pgylated lipoplexes to deliver DNA to tumors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 194-201, 2008.

---

MORILLE, M.; PASSIRANI, C.; VONARBOURG, A.; CLAVREUL, A.; JEAN-PIERRE, B. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. **Biomaterials**, v. 29, p.3477-3496, 2008.

MOZAFARI, M. R.; REED, C. J.; ROSTRON, C.; KOCUM, C.; PISKIN, E. Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v. 7, p. 923-927, 2002.

NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 159-195, 2000.

NEW, R. R. C. Liposomes – a practical approach. Oxford University Press, New York, 1990, 299p.

NGUYEN, L. T.; ATOBE, K.; BARICHELLO, J. M.; ISHIDA, T.; KIWADA, H. Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 4, p. 751-757, 2007.

NYBERG-HOFFMAN, C.; AGUILAR-CORDOVA, E. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. **Nature medicine**, v. 5, n. 8, p. 955-957, 1999.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. **The American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS Journal)** v. 6, n. 4, p. 1-8, 2004.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 7, n. 1, p. E61-E77, 2005.

RÄDLER, J. O.; KOLTOVER, J.;SALDITT, T.; SAFINYA, C. R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**, v. 275, n. 5301, p. 810-814, 1997.

RAMESH, R.; SAEKI, T.; TEMPLETON, N. S.; JI, L.; STEPHENS, L. C.; ITO, I.; WILSON, D. R.; WU, Z.; BRANCH, C. D.; MINNA, J. D.; ROTH, J.A. Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 3, p. 337-350, 2001.

RAPER, S. E.; CHIRMULE, N.; LEE, F. S.; WIVEL, N. A.; BAGG, A.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; BATSHAW, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, n. 1-2, p. 148-158, 2003.

ROSEMBERG, S. A.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K.; KASID, A.; MORGAN, R. A.; MOEN, R.; KARSON, E. M.; LOTZE, M. T.; YANG, J. C.; TOPALIAN, S. L. Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 570-578, 1990.

SAKAGUCHI, N.; KOJIMA, C.; HARADA, A.; KOIWAI, K.; KONO, K. The correlation between fusion capability and transfection activity in hybrid complexes of lipoplexes and pH-sensitive liposomes. **Biomaterials**, v. 29, p. 4029-4036, 2008.

SEDDON, J. M. Structure of the inverted hexagonal ( $H_{II}$ ) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1031, p. 1-69, 1990.

SHI, G.; GUO, W.; STEPHENSON, S. M.; LEE, R. J. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic / anionic lipid combinations. **Journal of Controlled Release** v. 80, p. 309-310, 2002.

SIEGEL, D. P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. **Biophysical Journal**, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

---

SILVA, S. M. L.; COELHO, L.; MALACHIAS, A.; PEREZ, C. A.; PESQUERO, J. L.; PANIAGO, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C. Study of the structural organization of cyclodextrin-DNA complex loaded anionic and pH-sensitive liposomes. **Chemical Physics Letters**, v. 506, p. 66-70, 2011.

SIMÕES, S., MOREIRA, J. N., FONSECA, C., DÜZGÜNES, N., LIMA, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 947-965, 2004.

SIMÕES, S.; SLEPUSHKIN, V.; DÜZGÜNES, N.; DE LIMA, M. C. P. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1515, p. 23-37, 2001.

SRINIVASAN, C.; BURGESS, D. J. Optimization and characterization of anionic lipoplex for gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, p. 62-71, 2009.

TAVARES, G. D.; VIANA, C. M.; ARAÚJO, J. G. V. C.; RAMALDES, G. A.; CARVALHO, W. S.; PESQUERO, J. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; OLIVEIRA, M. C. Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin-DNA complexes loaded liposomes. **Chemical Physics Letters**, v. 429, p. 507-512, 2006.

TAVARES, G. D. Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de lipossomas aniônicos pH-sensíveis para o transporte de DNA. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

TENENBAUM, L.; LEHTONEN, E.; MONAHAN, P.E. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. **Current Gene Therapy** v. 3, n. 6, p. 545-565. 2003.

---

TIMME, T. L.; HALL, S. J.; BARRIOS, R.; WOO, S. L.; AGUILAR-CORDOVA, E.; THOMPSON, T. C. Local inflammatory response and vector spread after direct intraprostatic injection of a recombinant adenovirus containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy in mice. **Cancer Genetic Therapy**, v. 5, n. 2, p.74-82, 1998.

TURNER, D. C.; GRUNER, S. M. X-ray Diffraction Reconstruction of the Inverted Hexagonal (HII) Phase in Lipid-Water Systems. **Biochemistry**, v. 31, p. 1340-1355, 1992.

WANG, Q. F., TILLY, K. Y., TILLY, J. L., PREFFER, F., SCHNEYER, A. L. Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5476-5483, 1996.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 255-264, 2006.

WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. Otimização Estatística de Processos: Como Determinar a condição de operação de um processo que leva ao alcance de uma meta de melhoria - Volume 9 da Série Ferramentas da Qualidade, Fundação Christiano Ottoni, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996, 331p.

YEW, N. S. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 769-80, 2005.

YING, S. Y.; ZHANG, Z.; XING, W. Expression of activin and activin receptors in PC3 human prostatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 6, p. 601-606, 1995.

YING, S. Y.; ZHANG, Z.; BATRES, Y.; ZHAO, Y.; LIN, S. L.; LI, G. p53 is involved in the inhibition of cell proliferation mediated by activin A in cultured human prostate cancer LNCaP cells. **International Journal of Oncology**, v. 11, p. 591-595, 1997.

ZHANG, Z.; ZHAO, Y.; BATRES, Y.; LIN, M. F.; YING, S. Y. Regulation of grown na prostatic marker expression by activin A in na androgen-sensitive prostate câncer cell line LNCaP, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, p. 362-365, 1997a

ZHANG, Z.; ZHENG, H.; ZHAO, Y.; LI, G.; BATRES, Y.; LUO, M. P.; WAN, M.; YING, S. Y. Overexpression of activin A inhibits grown, induces apoptosis, and suppresses tumorigenicity in an androgen-sensitive human prostate cancer cell line LNCaP. **International Journal of Oncology**, v. 11, p. 727-736, 1997b.

ZHU, N.; LIGGITT, D.; LIU, Y.; DEBS, R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. **Science**, v. 261, n. 5118, p. 209-211, 1993.

ZUIDAM, N. J.; HIRSCH-LERNER, D.; MARGULIES, S.; BARENHOLZ, Y. Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1419, p. 207-220, 1999.