

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Os avanços das pesquisas em biologia molecular resultaram na descoberta de seqüências gênicas de bactérias, vírus e protozoários como também de alterações genômicas humanas responsáveis pelo aparecimento de uma variedade de doenças, contribuindo assim para o desenvolvimento das terapias antisense e gênica (STEIN; CHENG, 1990; AKHTAR; AGRAWAL, 1997). A terapia antisense consiste na introdução no interior da célula de um fragmento de DNA ou RNA capaz de se hibridizar com uma seqüência complementar do mRNA localizado no citoplasma e/ou no núcleo, inibindo a tradução. Este acoplamento pode ocorrer também com o DNA nuclear, originando uma tríplice hélice, e conseqüentemente, impedindo a transcrição. A inibição, seja da transcrição ou da tradução do material genético de microrganismos ou de genes humanos modificados, poderá impedir o aparecimento de estados patológicos. Já a terapia gênica implica na inclusão celular de genes inexistentes ou ainda na correção de genes modificados através da inserção da seqüência gênica inalterada (MAHATO *et al.*, 1997a). Estas terapias podem constituir uma nova e promissora modalidade na prática médica para o tratamento de doenças resultantes de alterações moleculares dos ácidos nucléicos, tais como os diversos tipos de câncer e doenças degenerativas (ALMOFTI *et al.*, 2003).

No entanto, a eficácia destas terapias é limitada pela reduzida penetração celular de moléculas de RNA e/ou DNA e seus fragmentos, as quais são polianiônicas, como também por apresentarem instabilidade nos

líquidos celulares (WU; WU, 1991; KAWAHATA *et al.*, 1995 MAHATO *et al.*, 1997a). Por estes motivos, para a eficiência destas terapias há a necessidade do desenvolvimento de um efetivo sistema de liberação de moléculas de RNA e/ou DNA e seus fragmentos no interior das células (CORTESI *et al.*, 1996). Estes sistemas devem apresentar baixa toxicidade, ótima estabilidade, possuir um custo efetivo para sua produção, além de apresentarem uma capacidade de liberação eficiente e tecido-específica quando administrados *in vivo* (LEE *et al.*, 2002). Várias estratégias têm sido avaliadas para o estabelecimento de um adequado sistema de liberação de genes no interior das células, dentre elas têm-se proposto a utilização de vetores virais (adenovírus e retrovírus) ou não virais, e ainda, métodos físicos ou químicos. Os vetores virais mostram-se adequados para este propósito devido à sua habilidade natural em penetrar nas células de mamíferos e assumir o controle da replicação, transcrição e tradução. No entanto, apesar desta eficiência, estes vetores apresentam como inconveniente o aparecimento de uma resposta imunológica contra a proteína codificada pelo transgene (TEMIN, 1990; BYRNES *et al.*, 1995; CORTESI *et al.*, 1996; LESAGE *et al.*, 2002), além da dificuldade de sua produção em larga escala (TRIMAILLE *et al.*, 2003; IIONGTAO *et al.*, 2006). Por outro lado, métodos físicos (choque térmico, elétrico, osmótico) e químicos (solventes orgânicos, detergentes) envolvendo a modificação da permeabilidade da membrana celular têm sido utilizados, mas o emprego destes métodos em estudos *in vivo* é limitado (LEGENDRE; SKOZA, 1992; COLLINS, 1995). Dessa forma, a utilização de vetores não-virais, também denominados de vetores ou carreadores sintéticos, vem sendo amplamente investigada na tentativa de contornar as limitações citadas acima.

Os sistemas de liberação constituídos por vetores não-virais são baseados no uso de espécies catiônicas, as quais podem complexar os genes que, por sua vez, são carregados negativamente. Dessa forma, os genes são protegidos contra a degradação por DNAses e compactados para penetrar no interior celular via endocitose (MAHATO *et al.*, 1999b). Vários sistemas estão atualmente sob investigação, incluindo emulsões lipídicas catiônicas, dendrímeros, polímeros e lipossomas catiônicos (LIU *et al.*, 2003; LAMPELA *et al.*, 2004). Tais sistemas apresentam vantagens em relação aos demais métodos empregados para a liberação de genes, já que podem não induzir o desencadeamento de resposta imune, além de serem facilmente preparados (PATIL *et al.*, 2005a). Entretanto, estes sistemas catiônicos têm apresentado efeitos citotóxicos, uma eficiência de transfecção variável e a produção de partículas de tamanho heterogêneo, o que implica na instabilidade das preparações e baixos níveis de transfecção (DUFÉS *et al.*, 2005).

Portanto, uma alternativa para contornar os inconvenientes supracitados seria o desenvolvimento de um nanosistema aniônico para transporte de ácidos nucléicos. Desta forma, na presente dissertação de mestrado foi desenvolvido e caracterizado do ponto de vista físico-químico e biológico um novo vetor sintético carreador de moléculas de DNA baseado em lipossomas aniônicos pH-sensíveis. O novo vetor foi obtido mediante a complexação prévia de moléculas de DNA com ciclodextrina catiônica, seguida da encapsulação do complexo DNA/ciclodextrina catiônica neste nanosistema aniônico.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1- LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE GENES

1.1 – TERAPIA GÊNICA

O conceito de terapia gênica pode ser aplicado a qualquer procedimento em que seqüências nucleotídicas são intencionalmente introduzidas ou modificadas em tecidos ou células. Em geral, introduz-se moléculas de DNA de genes normais que irão repor as funcionalidades de genes correspondentes que se encontram mutados. Assim, após a transfecção, as células podem ser induzidas a produzir substâncias com atividade fisiológica ou farmacológica, como hormônios ou proteínas específicas (GODBNEY; MIKOS, 2001).

Atualmente, numerosas tentativas de restauração da expressão gênica vêm sendo realizadas a partir da liberação de genes exógenos no interior das células sendo que, durante os últimos 15 anos, mais de 400 estudos clínicos envolvendo a terapia gênica têm sido avaliados (EL-ANEED, 2004). Desta forma, um grande número de doenças tem se tornado alvo para a aplicação desta terapia. Como exemplo, pode-se citar a fibrose cística, hemofilia A e B, diabetes *mellitus* insulino-dependente e distrofia muscular *Duchenne*. Além disto, a terapia gênica também tem sido identificada como uma possibilidade de tratamento do câncer (McTAGGART; AL-RUBEAI, 2002).

1.2. – SISTEMAS DE LIBERAÇÃO EMPREGADOS NOS ESTUDOS DE TERAPIA GÊNICA

As moléculas de DNA e/ou seus fragmentos, os quais constituem peça fundamental na ciência da terapia gênica, apresentam-se como estruturas de grande dimensão e negativamente carregadas, o que ocasiona a reduzida penetração celular destas moléculas. Além disso, estas são facilmente degradadas por enzimas citoplasmáticas, como DNAses. Esta confluência de fatores faz com que a administração do material genético em sua forma livre seja limitada (WU; WU, 1991; KAWAHATA *et al.*, 1995 MAHATO *et al.*, 1997a, LAMPELA *et al.*, 2004). Apesar disto, alguns estudos foram feitos utilizando métodos físicos (choque térmico, elétrico, osmótico) e químicos (solventes orgânicos, detergentes) com o objetivo de modificar a permeabilidade da membrana celular a fim de facilitar a internalização da molécula de DNA livre. Porém, o emprego destes métodos em estudos *in vivo* demonstram ser limitados (LEGENDRE; SKOZA, 1992; COLLINS, 1995).

Por estes motivos, para o sucesso e a eficácia da terapia gênica, torna-se necessário a construção de um adequado carreador que permita um eficiente transporte das moléculas de DNA desde o sítio de administração até o local específico de ação, liberando prontamente o material genético no interior da célula de forma que este consiga alcançar e penetrar no núcleo a fim de exercer sua ação. Além disto, um vetor adequado deve apresentar-se estável, com um custo efetivo para sua produção e ser isento de toxicidade (CORTESI *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2002).

Vários estudos têm sido realizados utilizando como constituintes os vetores virais, os quais são adequados para este propósito devido à sua

habilidade natural em penetrar nas células de mamíferos e assumir o controle da replicação, transcrição e tradução. Estes vetores são modificados em laboratório a fim de eliminar sua patogenicidade, mantendo, contudo, sua habilidade de transfecção (EL-ANEED, 2004). No entanto, apesar de serem os mais efetivos carreadores para a transfecção, estes vetores possuem limitações no que diz respeito ao tamanho do material genético a ser encapsulado e apresentam como inconveniente o aparecimento de uma resposta imunológica contra a proteína codificada pelo transgene, inibindo sua expressão (TEMIN, 1990; BYRNES *et al.*, 1995; CORTESI *et al.*, 1996; LESAGE *et al.*, 2002; EL-ANEED, 2004). Além disto, há a possibilidade de ocasionarem mutagenicidade e carcinogênese e a dificuldade de sua produção em larga escala (LIU; HUANG, 2002; TRIMAILLE *et al.*, 2003).

Assim, vários estudos têm se concentrado no desenvolvimento de novos sistemas para o adequado transporte de DNA exógeno, os quais são denominados vetores sintéticos ou não-virais (OKU *et al.*, 2001). Em geral, os vetores não-virais são compostos por três elementos essenciais, a saber: o gene responsável pela expressão da proteína de interesse; o sistema de expressão plasmidial, que controla a função do gene no interior da célula e o carreador sintético, o qual controla a estabilidade e a liberação do gene no interior das células (MAHATO, 2005c).

São várias as estratégias com a finalidade de melhoria nos níveis de transfecção, toxicidade e estabilidade dos carreadores sintéticos para uso em terapia gênica. Contudo, de maneira geral, os sistemas de liberação constituídos por vetores não-virais são baseados no uso de espécies catiônicas, as quais podem complexar os genes que, por sua vez, são

carregados negativamente. Dessa forma, os genes serão protegidos contra a degradação por DNAses e compactados para penetrar no interior celular (MAHATO *et al.*, 1999b). Vários diferentes sistemas estão atualmente sob investigação, e podem ser comumente classificados em dois grupos principais, de acordo com a natureza do material sintético empregado: sistemas de liberação polimérica e sistemas de liberação lipossomal (LIU *et al.*, 2003; LAMPELA *et al.*, 2004; PATIL *et al.*, 2005a).

1.2.1 – Polímeros

Os polímeros catiônicos são comumente utilizados na liberação de genes devido à relativa facilidade de complexação com a molécula do material genético carregada negativamente. O mecanismo de ação geral do complexo polímero-DNA é baseado na interação eletrostática entre este complexo, o qual apresenta carga residual positiva, e a membrana celular carregada negativamente. Esta interação, por sua vez, permite a internalização do DNA no interior das células. As principais vantagens destes carreadores sintéticos são relacionadas à versatilidade de suas propriedades físico-químicas, aliada à sua fácil manipulação e produção a um baixo custo.

Os polímeros mais comumente utilizados incluem as polietileniminas (PEI), a poli(L-lisina), as quitosanas e os dendrímeros, os quais apresentam algumas vantagens para utilização em terapia gênica, porém não são considerados os vetores ideais para este propósito. Além da baixa capacidade de transfecção, os sistemas poliméricos apresentam alguns problemas relacionados à heterogeneidade na distribuição de tamanho de suas partículas (PATIL *et al.*, 2005a).

1.2.1.1. Polietileniminas

As polietileniminas (PEI's), as quais são disponíveis nas formas linear ou ramificada, apresentam um grande potencial para a transfecção. Este alto nível de transfecção pode ser atribuído ao efeito tamponante originado pela presença de grupamentos aminos nestas moléculas, de forma que as mesmas conseguem escapar rapidamente do interior dos endossomas, liberando o material genético no citoplasma celular (GODBEY; MIKOS, 2001). No entanto, existem relatos de que estes polímeros podem ser extremamente tóxicos, já que são capazes de induzir apoptose. A citotoxicidade e a eficiência de transfecção são diretamente proporcionais ao peso molecular das PEI's, de forma que investigações no sentido de síntese de novos derivados de PEI's estão em andamento (LECLERCQ *et al.*, 2000; PETERSEN *et al.*, 2002).

1.2.1.2. Poli(L-lisina)

A Poli(L-lisina) (PLL) é um polímero catiônico biodegradável que interage com as moléculas aniônicas do DNA formando um complexo com carga residual positiva. Este complexo interage com a superfície celular carregada negativamente, promovendo assim, a rápida internalização do DNA (PATIL *et al.*, 2005a). Entretanto, a PLL apresenta baixo nível de transfecção em virtude de sua incapacidade de escapar dos endossomas, o que leva à degradação das moléculas de DNA (AKINC; LANGER, 2002). A eficiência de transfecção do complexo PLL/DNA mostrou-se maior após seu pré-tratamento com agentes endosomolíticos, como a cloroquina (WOLFERT; SEYMOUR, 1998). Além disto, a PLL apresenta imunogenicidade, toxicidade e formulações de complexo

com DNA apresentando elevado grau de polidispersão (MUMPER; KLAKAMP, 1999; LUO; SALTZMAN, 2000).

1.2.1.3. Quitosanas

Estes polímeros catiônicos são compostos por moléculas de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, sendo atóxicos e biodegradáveis. Igualmente aos polímeros anteriores, são capazes de promover uma interação eletrostática com as moléculas de DNA, protegendo-a da degradação por nucleases (MANSOURI *et al.*, 2006). Estes vetores, por apresentarem baixa toxicidade, são uma alternativa à utilização das PEI's. Entretanto, sua eficiência de transfecção mostra-se usualmente menor quando em comparação aos demais polímeros utilizados com a mesma finalidade (PATIL *et al.*, 2005a).

1.2.1.4. Dendrímeros

Os dendrímeros possuem uma arquitetura molecular única e propriedades específicas que os tornam materiais atrativos para o desenvolvimento de novos vetores sintéticos para aplicação em terapia gênica (DUFÉS *et al.*, 2005). As características físico-químicas dos dendrímeros, em particular sua elevada densidade de carga e solubilidade em água, permitem uma adequada interação entre estes polímeros e as moléculas de DNA (ROESSLER *et al.*, 2001) A estrutura esférica tridimensional destes polímeros é importante para o controle da síntese dos mesmos no que diz respeito ao grau de ramificações. A partir deste controle, pode-se produzir partículas com baixos níveis de polidispersão, o que é importante do ponto de vista da eficiência de transfecção. Superfect® e Polyfect® são duas preparações

comerciais disponíveis para utilização em protocolos de transfecção *in vitro* (PATIL *et al.*, 2005a).

1.2.2 – Lipossomas

1.2.2.1 – Lipossomas catiônicos

Na terapia gênica, sistemas de transfecção baseados em lipossomas apresentam certas vantagens quando comparados aos vetores virais, incluindo a ausência de imunogenicidade e a possibilidade de introduzir longos fragmentos de DNA no compartimento intracelular (SUBRAMANIAN *et al.*, 2000). Assim, dentre os carreadores mais amplamente estudados para aplicação em terapia gênica, os lipossomas têm recebido uma maior atenção, em particular aqueles carregados positivamente. Este fato se explica, não somente devido a estes vetores serem formulados, em geral, a partir de lípides biocompatíveis e biodegradáveis (SHARMA; SHARMA, 1997), mas, principalmente, pelo fato de apresentarem os melhores níveis de transfecção quando comparados aos demais sistemas sintéticos utilizados com o mesmo propósito. Desta forma, várias formulações à base de lipossomas catiônicos têm sido avaliadas em ensaios clínicos, como por exemplo, contra o câncer e a fibrose cística (ZHANG *et al.*, 2005).

Desde sua introdução por Felgner e colaboradores (1987), o uso de lipossomas catiônicos mostra-se como um dos caminhos mais promissores para introduzir um gene exógeno no interior das células (HASEGAWA *et al.*, 2002). Estes lipossomas são constituídos por lípides catiônicos sintéticos, tais

como o brometo de dioleoiloxipropiltrimetilamônio (DOTMA), cloreto de dioctadecildimetilamônio (DOGS) e [3 β (N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]-colesterol (DC-CHOL), capazes de compactar o material genético carregado negativamente como resultado de interações eletrostáticas entre ambos, apresentando boa eficiência de encapsulação. A penetração celular destes vetores sintéticos carregados positivamente, contendo o material genético, ocorre em consequência de interações eletrostáticas com a membrana celular, resultando na sua fusão com a superfície celular ou na sua endocitose. A liberação do material genético no citoplasma e/ou no núcleo, para que possa se ligar ao sítio de ação (RNA e/ou DNA), ocorre em decorrência de troca de lípidos entre os lipossomas catiônicos e os lípidos dos endossomas, através de movimentos de flip-flop (XU; SKOZA, 1996).

Todavia, alguns dos complexos formados por lípidos catiônicos/DNA são tóxicos em decorrência da alteração da permeabilidade celular, o que pode limitar sua utilização. Esta toxicidade depende da confluência da monocamada de células, da razão lípide:DNA, do tempo de exposição e da presença ou ausência de soro. Além disto, o metabolismo celular pode ser alterado pela incorporação de lípidos que não sejam biodegradados no interior das membranas biológicas. Por exemplo, lipossomas catiônicos podem afetar seletivamente a função de enzimas intracelulares, incluindo a fosfoquinase C (PKC), cuja função está relacionada à fosforilação de proteínas que penetram no interior do núcleo de linfócitos e ativam a transcrição do RNA mensageiro para a síntese de interleucinas. A PKC realiza também a fosforilação de proteínas responsáveis pela liberação destas interleucinas para o meio externo,

culminando na estimulação da resposta imune celular e/ou humoral (LIANG; HUGHES, 1998; CLARCK; HERSH, 1999).

KUO e colaboradores (2005) descrevem que uma das maiores desvantagens dos lipossomas catiônicos é a de que os complexos resultantes entre estes sistemas e o DNA não se apresentam estáveis, podendo originar agregados ou floculados, os quais contribuem para baixos níveis de liberação do material genético no interior das células. Além disto, existem relatos de que os lipossomas catiônicos, especialmente aqueles compostos por lípides monovalentes, não condensam eficientemente a molécula de DNA, o que resulta em heterogeneidade na distribuição de tamanho dos complexos, dificultando o processo de transfecção (LIU; HUANG, 2002).

CORTESI e colaboradores (1996) investigaram a citotoxicidade de diferentes formulações de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina (PC), colesterol (CHOL) e por três diferentes surfactantes catiônicos (CS), como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), brometo de didodecildimetilamônio (DDAB₁₂) e brometo de dioctadecildimetilamônio (DDAB₁₈), na razão molar de 8:2:1(PC:CHOL:CS). Utilizando células leucêmicas humanas (K562), os resultados deste estudo demonstraram que os lipossomas cujas formulações eram compostas por CTAB e DDAB₁₂ apresentaram citotoxicidade bastante pronunciada, com valores de IC₅₀ iguais a 0,88 µM e 0,85 µM, respectivamente.

O estudo realizado por PATEL e colaboradores (2001), utilizando lipossomas compostos por DOPE em associação com o lípido catiônico diacetileno-bisguanidina (concentração lipídica total igual a 20 mM e razão molar igual a 3:2, respectivamente) para a transfecção do plasmídeo pCMV-Luc, mostrou que estes lipossomas, na razão de carga igual a +3/- apresentam

uma citotoxicidade significativa (46%). Esta toxicidade tornou-se maior à medida que a razão de cargas +/- era aumentada.

ROMØREN e colaboradores (2004) avaliaram a eficiência de transfecção do plasmídeo pcDNA3-Luc, responsável pela expressão da enzima luciferase, e a citotoxicidade de lipossomas catiônicos compostos por DOPE e 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP), razão molar 1:1. Estes lipossomas foram avaliados frente a células de origem hepática (RTH-149) e macrófágica (RTS-11) oriundas do salmão. O estudo mostrou que a eficiência de transfecção variava de acordo com a razão de cargas do complexo lipossomas catiônicos/DNA bem como com a quantidade de DNA adicionada aos lipossomas, sendo que a linhagem RTH-149 foi mais eficazmente transfectada quando comparada às células RTS-11. Além disso, os resultados demonstraram que os lipossomas catiônicos apresentam toxicidade dose-dependente, sendo que estes foram mais tóxicos frente à linhagem macrófágica.

Diante do exposto, a busca por um vetor sintético ideal continua a incentivar a investigação na área da liberação intracelular de genes.

1.2.4.2 – Lipossomas aniônicos

A fim de contornar os inconvenientes advindos da utilização dos lipossomas catiônicos, alguns pesquisadores têm estudado o emprego de lipossomas aniônicos para a liberação intracelular de genes (CRESPO *et al.*, 1996; FILLION *et al.*, 2001a; MOZAFARI *et al.*, 2002; PATIL *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por CRESPO e colaboradores (1996), a eficiência de lipossomas catiônicos e aniônicos como carreadores de DNA foi comparada *in vivo*. Neste trabalho, o plasmídeo pTG7101, contendo o gene humano α 1-antitripsina (AAT), foi encapsulado em lipossomas aniônicos compostos por fosfatidilcolina(PC):(CHOL):fosfatidilserina(PS) ou PC:CHOL:PS:monosialogangliosídeo-GM1 (GM1), na razões molares de 5:4:1 e 4:4:1:1, respectivamente. Os lipossomas catiônicos foram formados mediante a mistura de lipossomas compostos por PC:CHOL (razão molar igual a 5:4) ou PC:CH:GM1 (razão molar igual a 4:4:1), com o complexo DOTAP-pTG710. A expressão da proteína humana foi detectada no plasma dos ratos, por um período de 2 a 3 semanas, independentemente da carga superficial dos lipossomas. Além disto, foi observado que a eficiência de liberação do gene foi limitada quando este estava associado aos lipossomas catiônicos.

FILLION e colaboradores (2001) propuseram a utilização de um lipossoma fluido carregado negativamente para a encapsulação de um oligonucleotídeo antisense (anti- β -galactosidade) bem como do plasmídeo pUC18. No estudo, os lipossomas foram formulados com os fosfolipídios sintéticos dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) na razão molar de 10:1, em presença de solução de um sal monovalente (NaCl, KCl, NaHCO₃ ou tampão fosfato), sendo avaliadas a taxa de encapsulação e a atividade antisense sobre *E. coli* CSH36. Como resultados, foram encontrados ótimos níveis de encapsulação: 48,9% e 43,5% para o plasmídeo purificado e para o oligonucleotídeo antisense, respectivamente. Além disto, foi demonstrado que cerca de 57% das células bacterianas conseguiram integrar em seu genoma o nucleotídeo antisense anti-*lacZ*; o que

resultou em uma redução de 42% na atividade da enzima β -galactosidase, sendo que o mesmo oligonucleotídeo, em sua forma não encapsulada, ocasionou redução de apenas 6%.

No estudo conduzido por MOZAFARI e colaboradores (2002), foi desenvolvida uma formulação de lipossomas constituída por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC): dicetilfosfato (DCP): CHOL (na razão molar de 7:2:1, respectivamente). Para a formação de um complexo ternário como possível vetor de transfecção, o plasmídeo pcDNA3, responsável pela expressão da enzima β -galactosidase, e uma solução aquosa contendo 50mM de íons Ca^{+2} foram adicionados à dispersão dos lipossomas. A eficiência de transfecção e a citotoxicidade deste sistema foram investigadas utilizando a linhagem celular 16HBE14o (células epiteliais de brônquio). O sistema obtido não apresentou citotoxicidade nas condições experimentais empregadas, no entanto, mostrou uma menor eficiência de transfecção que o reagente catiônico DOTAP de uso comercial.

De maneira semelhante, PATIL e colaboradores (2005) propuseram nova formulação de lipossomas aniônicos baseada na obtenção de um complexo ternário. Este sistema é composto por 1,2-dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), DOPE (razão molar igual a 17:83, respectivamente); o plasmídeo pCMV-GFP, responsável pela expressão da proteína verde fluorescente, e íons Ca^{+2} . Ensaios de transfecção, utilizando células *Chinese Hamster Ovary* (CHO), mostrou que o complexo ternário é capaz de produzir altos níveis de transfecção, com boa reprodutibilidade. No entanto, apenas os lipossomas e o DNA plasmidial bem como o plasmídeo em sua forma livre apresentaram níveis de transfecção negligenciáveis. E ainda, a formulação desenvolvida neste

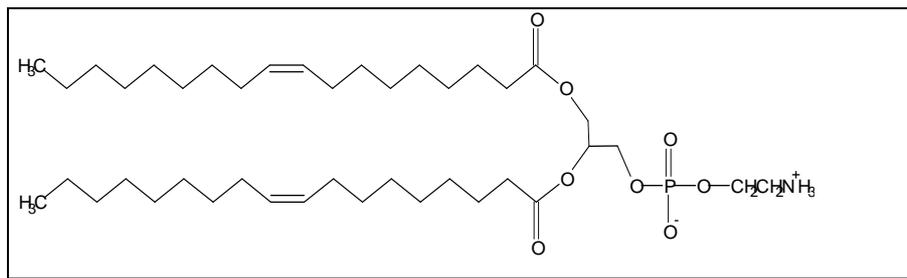
estudo mostrou-se comparável ao lipossoma catiônico comercial Lipofectamine[®], no que diz respeito à eficiência de transfecção e reprodutibilidade.

Portanto, visando contornar os possíveis efeitos citotóxicos dos lipossomas catiônicos, a proposta desta dissertação de mestrado é o desenvolvimento de um novo carreador lipossomal para o transporte de DNA. Este sistema trata-se de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo ciclodextrina catiônica/DNA.

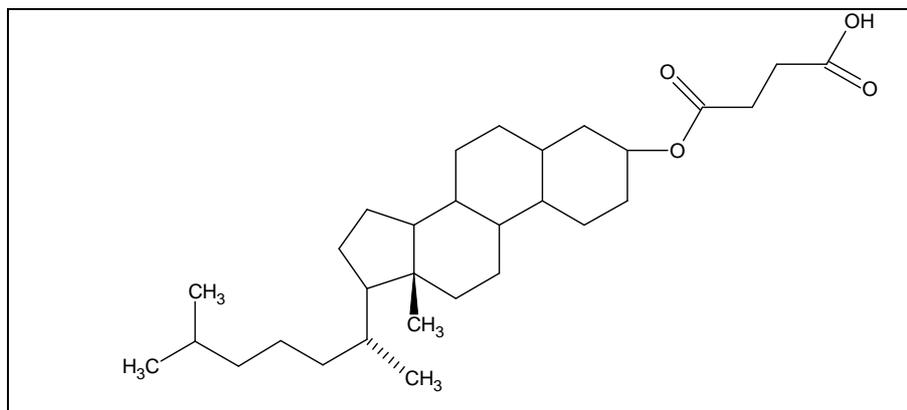
1.2.4.3 - Lipossomas pH-sensíveis

As diferentes composições da membrana dos lipossomas, além de influenciarem a sua biodistribuição *in vivo*, podem alterar a forma de liberação do conteúdo encapsulado. Em particular, a composição pode ser desenvolvida de forma que a liberação seja sítio-específica em resposta às condições ambientais, tanto em nível anatômico, celular ou subcelular. Uma das estratégias para permitir este tipo de liberação é o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis (OZER, *et al.*, 1993). O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de drogas foi sugerido a partir da observação de que tecidos patológicos (tumores, metástases, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Estes lipossomas apresentam transição de fases, características dos seus constituintes fosfolipídicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido.

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolipídios derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 1A). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal (Figura 2), não sendo capazes de se apresentarem na forma de vesículas (forma lamelar). Os derivados da PE apresentam uma pequena parte polar, a qual ocupa uma menor área quando comparada àquela relativa à cadeia de ácidos graxos, resultando numa geometria molecular do tipo cone (Figura 2) (SIEGEL *et al.*, 1986). Estes derivados apresentam uma baixa hidratação e em termos de organização supramolecular se arranjam em estrutura hexagonal. A formação de lipossomas com estes fosfolipídios requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS) (Figura 1B), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Estes estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas dos fosfolipídios, sendo que o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolipídios favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas (SIMÕES *et al.*, 2004).



(A)



(B)

Figura 1 - Estrutura química da dioleoilfosfatidiletanolamina (A) e do hemisuccinato de colesterila (B).

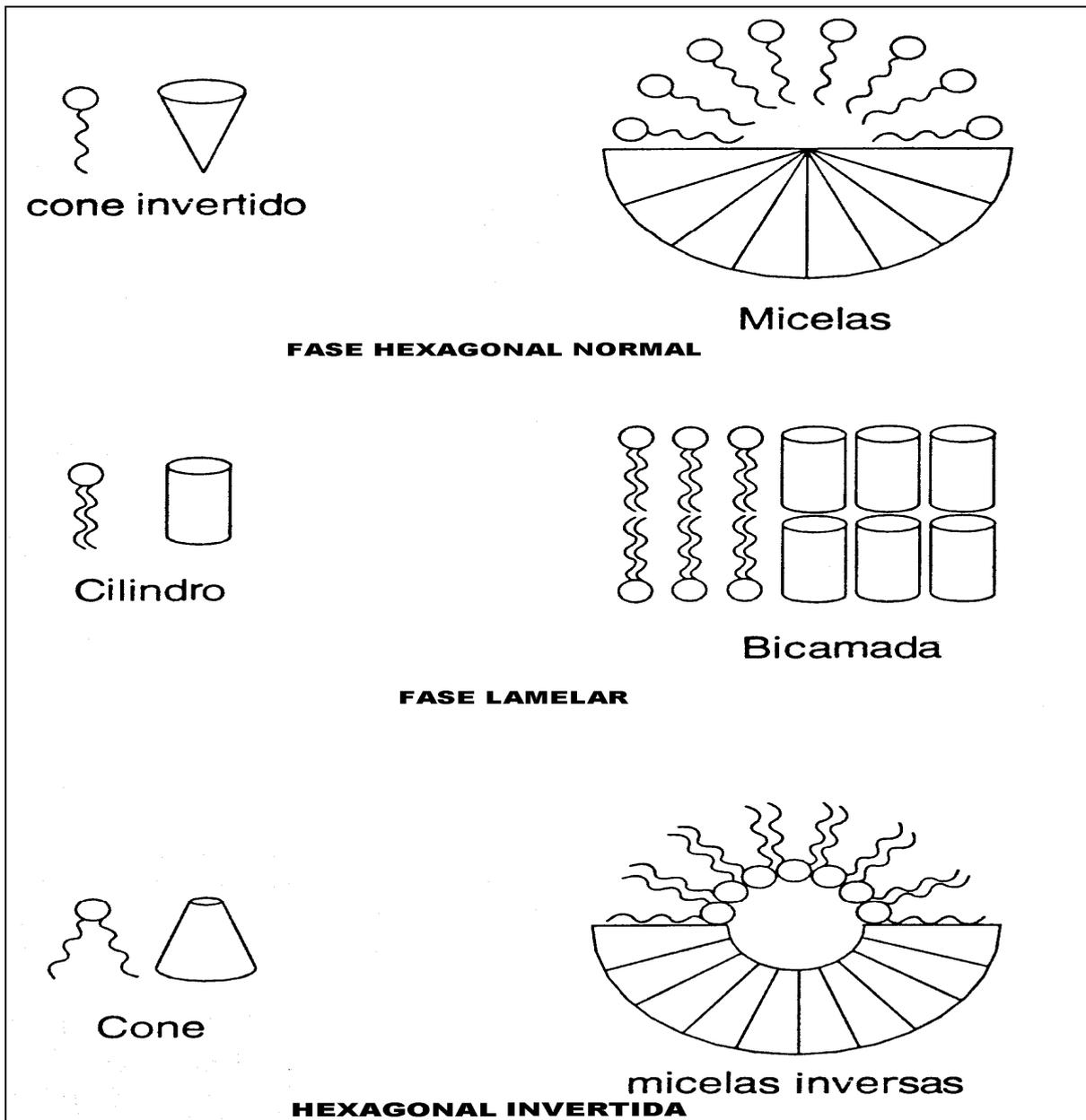


Figura 2 – Transições de fases de lípides (Adaptado de LASIC, 1998).

Os lipossomas pH-sensíveis liberam o material encapsulado, explorando o processo de acidificação endossomal, o qual leva à desestabilização destas vesículas, já que os derivados da fosfatidietanolamina (PE) em meio ácido adotam, preferencialmente, a forma hexagonal em detrimento à forma lamelar (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000). Portanto, após serem endocitados estes lipossomas se desestabilizam e/ou fusionam com a membrana dos

endossomas quando o pH no interior destes torna-se ácido, ao longo de sua maturação, provocando assim a liberação do material encapsulado no citoplasma (Figura 3). Esta série de eventos impedirá a fusão dos endossomas com os lisossomas, e conseqüentemente, evitará a degradação das moléculas de DNA pelas enzimas presentes neste último (COLLINS, 1995).

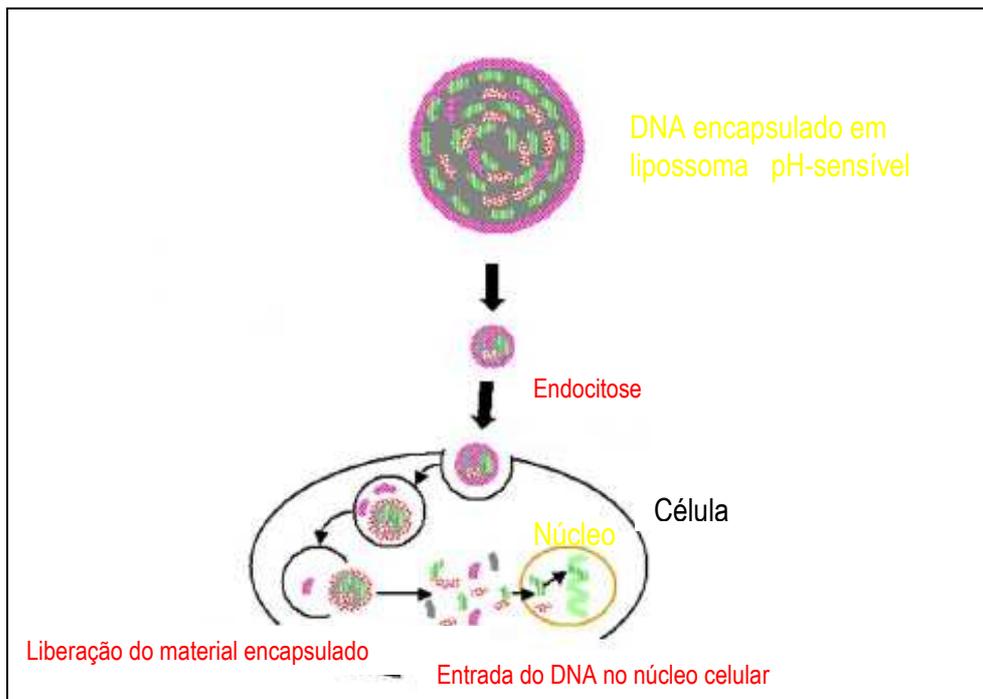


Figura 3 – Ilustração esquemática da liberação do material encapsulado em lipossomas pH-sensíveis (Adaptado de DE LAPORTE *et al.*, 2006)

A versatilidade dos lipossomas pH-sensíveis pode ser bem ilustrada em uma ampla gama de aplicações, tais como: (a) o transporte de sondas fluorescentes que permitem não somente avaliar a eficácia de diferentes composições de lipossomas, como também esclarecer os mecanismos envolvidos em seu tráfego intracelular; (b) a liberação eficiente de drogas antineoplásicas ou proteínas recombinantes; (c) o transporte intracelular de

antígenos; (d) o transporte intracelular de material genético para aplicação nas terapias antisense e gênica (SIMÕES *et al.*, 2004).

Em se tratando da utilização destes veículos para a liberação de genes no interior das células, DÜZGÜNES e colaboradores (2001) relataram que a habilidade em liberar moléculas com massa molar relativamente alta, como por exemplo, os oligonucleotídeos antisense, é significativamente maior para lipossomas compostos por DOPE/CHEMS em comparação com outros lipossomas pH-sensíveis compostos por DOPE em associação com outros agentes estabilizantes. LEGENDRE & SKOZA (1992) também demonstraram que lipossomas pH-sensíveis são adequados em mediar a transferência de genes *in vitro*. Neste estudo, foram comparadas as eficiências de transfecção entre lipossomas pH-sensíveis (DOPE: CHEMS, na razão molar de 2:1), não-pH-sensíveis compostos por PS:CHOL (razão molar igual a 1:1) e dioleoilfosfatidilcolina: CHEMS (DOPC: CHEMS; razão molar de 2:1) e catiônicos constituídos por DOPE: brometo de dioleoiloxipropiltrimetilamônio (DOPE: DOTMA, razão molar igual a 1:1) utilizando diferentes genes e cinco diferentes linhagens celulares (CV-1, p388D1, HepG2, HeLa e KD83). Para todas as linhagens investigadas, os lipossomas catiônicos demonstraram os melhores níveis de eficiência de transfecção, seguidos dos lipossomas pH-sensíveis. Os lipossomas não-pH-sensíveis, não induziram transfecção em nenhum dos experimentos. Os autores explicam tal resultado partindo do pressuposto de que os lipossomas catiônicos utilizam, pelo menos, dois caminhos principais para penetrarem no interior das células: fusão com a membrana plasmática ou endocitose, ao passo que os lipossomas pH-sensíveis utilizam preferencialmente o caminho endocítico.

2. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CD's), também denominadas dextrinas de Schardinger, cicloamiloses, ciclomalto-oligossacarídeos ou ciclomaltoses, são substâncias conhecidas há mais de um século, depois de identificadas por Villiers em 1891. A sua obtenção foi conseguida a partir da degradação do amido, quando da presença do *Bacillus amilobacter*. A substância cristalina obtida foi denominada "cellulosine" dada a sua semelhança com a celulose (FERNANDES; VEIGA, 1999). No entanto, foi Frank Schardinger quem, entre 1903 e 1911, descreveu a sua preparação, separação e propriedades, a partir do isolamento de um novo organismo capaz de produzir grandes quantidades de ciclodextrinas: o *Bacillus macerans* (DEL VALLE, 2004).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos podendo apresentar seis, sete ou oito unidades de D-glicopiranosídeos, unidas por ligações α -1,4, sendo denominadas como α , β e γ ciclodextrina, respectivamente. Estes oligossacarídeos possuem o formato tronco-cônico (Figura 4), cuja parte interna apresenta carácter hidrofóbico, responsável pela inclusão de moléculas hidrofóbicas, com conseqüente aumento de sua solubilidade. A face externa das ciclodextrinas é constituída pelas hidroxilas ligadas ao C-2, C-3, C-6, o que permite a solvatação pelas moléculas de água, assim como a introdução de substituintes sem alterar a cavidade interna (FROMMING; SZETLI, 1993; FERNANDES; VEIGA, 1999).

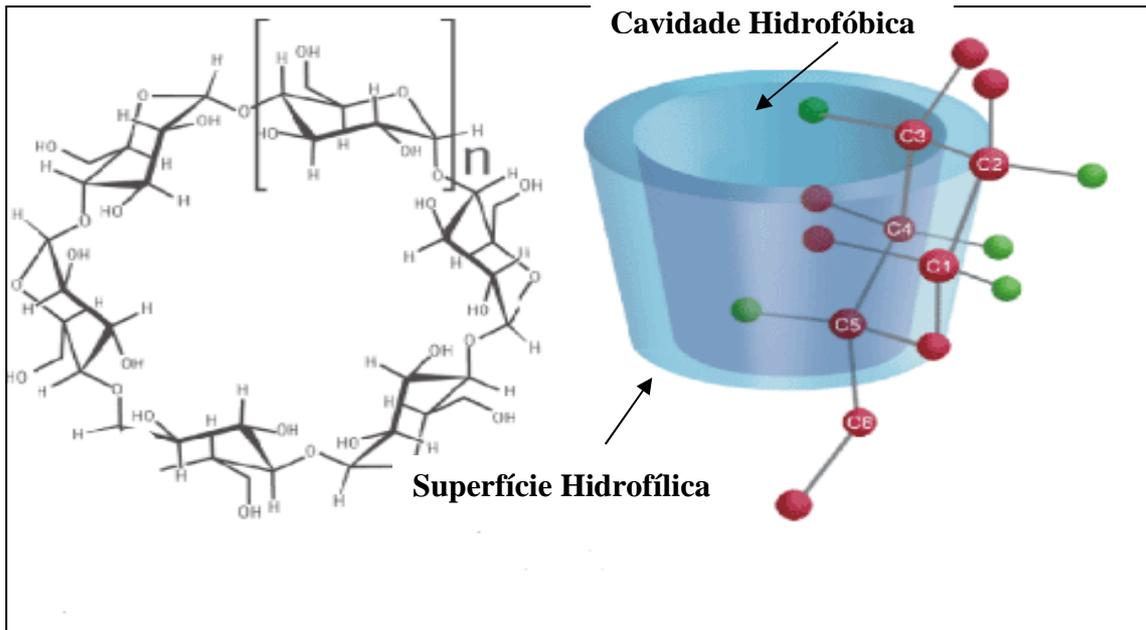


Figura 4 – Estrutura esquemática das ciclodextrinas (DEL VALLE, 2002).

A β -ciclodextrina é a mais utilizada por razões envolvendo custo, disponibilidade, aprovação junto às autoridades sanitárias para a sua administração e dimensão de sua cavidade. Sendo que, a β -ciclodextrina catiônica contém substituintes do tipo amônio quaternário (CARPENTER *et al.*, 1995; LOFTSSON; BREWSTER, 1996). As interações entre as moléculas de ciclodextrina catiônica e as moléculas de DNA poderão ser do tipo eletrostáticas, devido às cargas contrárias, como também do tipo hidrofóbicas entre a sua cavidade hidrofóbica e as bases pirimidínicas e púricas do DNA, conduzindo assim à sua compactação. Essa compactação possivelmente acarretará na diminuição do tamanho da molécula de DNA, permitindo uma maior taxa de encapsulação da mesma nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis.

Em estudo realizado por CRYAN e colaboradores (2004), ciclodextrinas neutras e catiônicas foram comparadas quanto à sua eficiência como

carreadores de DNA. β -ciclodextrinas catiônicas (β -CD) apresentando os grupamentos piridilamino, 1-n-butil-1H-imidazol, metoxietilamino e amino 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. Os experimentos para a avaliação da transfecção foram realizados empregando-se células COS-7 e mostraram a seguinte ordem de eficiência de transfecção: amino- β -CD > piridilamino- β -CD > 1-n-butil-1H-imidazol- β -CD > metoxietilamino- β -CD > dimetil- β -CD. O derivado heptakispiridilamino- β -CD, na razão de nitrogênio/fósforo do complexo β -CD/DNA igual a 280, produziu um aumento de aproximadamente 4000 vezes nos níveis de transfecção quando comparado aos níveis de transfecção do plasmídeo não complexado. Além disso, na presença de soro, o nível de transfecção desse derivado mostrou-se comparável ao do lípide catiônico DOTAP, na razão de carga igual a +1/-2,4. No entanto, esse derivado assim como a amino- β -CD apresentaram toxicidade em cultura de células COS-7 com o aumento da razão de nitrogênio/fósforo no complexo β -CD/DNA.

No estudo conduzido por HWANG e colaboradores (2001), foram sintetizados derivados da β -ciclodextrina conjugados a um polímero para avaliação da transfecção e citotoxicidade. Neste trabalho, o carreador sintético foi preparado através da condensação da β -ciclodextrina com o diimidato comonômero, formando a 6A,6D-dideoxi-6A,6D-di(2-aminoetanotio)- β -ciclodextrina (β CPD). Para a síntese dos derivados de β CPD, foi utilizado o comonômero com 4, 5, 6, 7, 8 e 10 unidades de metileno, os quais, após polimerização com a β -ciclodextrina, originaram polímeros catiônicos com diferentes quantidades de grupos metileno, denominados β CPD4, β CPD5,

β CPD6, β CPD7, β CPD8 e β CPD10, respectivamente. Estes polímeros catiônicos foram, então, misturados ao plasmídeo pGL3-CV ou ao plasmídeo pCA-EGFP, responsáveis pela expressão da enzima luciferase e proteína verde fluorescente, respectivamente. A fim de se avaliar a eficiência de transfecção deste sistema, foi utilizada a linhagem celular BHK-2, e os complexos polímero catiônico/plasmídeo foram preparados em diferentes razões de carga. Os resultados demonstraram a seguinte ordem de eficiência de transfecção, dependendo do número de grupos metileno presentes na estrutura do polímero: β CPD6 > β CPD8 > β CPD7 > β CPD4 > β CPD10 > β CPD5. A citotoxicidade destes diferentes polímeros de β -ciclodextrina revelou a seguinte ordem de concentração inibitória do crescimento celular em 50% (IC50): β CPD8 (2200 μ M) < β CPD7 (1800 μ M) < β CPD6 (1100 μ M) < β CPD4 (380 μ M) < β CPD5 (350 μ M) < β CPD10 (330 μ M).

Desta forma, a estratégia de se utilizar lipossomas aniônicos pH-sensíveis para encapsular moléculas de DNA complexadas com moléculas de ciclodextrinas catiônicas pode ser interessante e, de acordo com o nosso conhecimento, não existe até o momento nenhum relato na literatura relativo à mesma.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica de um novo carreador de ácidos nucleicos, sendo este constituído por lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA.

2. Objetivos específicos

1- Obtenção do complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA.

2- Encapsulação do complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA em lipossomas aniônicos pH-sensíveis.

3- Caracterização físico-química dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -ciclodextrina/DNA com relação à determinação da taxa de encapsulação, diâmetro médio e potencial zeta.

4- Caracterização morfológica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA por microscopia de força atômica.

5- Avaliação da citotoxicidade em células *Chinese Hamster Ovary* (CHO) dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA.

TRABALHO EXPERIMENTAL

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA

I – DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS PARA O TRANSPORTE DE DNA

1. INTRODUÇÃO

A estratégia investigada para permitir a encapsulação de moléculas de DNA nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis foi a complexação prévia das mesmas com um derivado de β -ciclodextrina catiônica, a 6-monodeoxi-6-monoamina- β -ciclodextrina (β -CD⁺). A formação do complexo β -CD⁺/DNA visa promover a compactação das moléculas de DNA, a fim de possibilitar o alcance de sua encapsulação efetiva em lipossomas aniônicos pH-sensíveis. Como processo de preparação dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis foi adotado o método de evaporação em fase reversa (REV), o qual favorece a encapsulação de substâncias hidrofílicas, como o complexo β -CD⁺/DNA. Este método foi inicialmente descrito por SKOZA & PAPAHDJOUPOULOS (1978) e fundamenta-se na obtenção inicial de uma emulsão de água em óleo (A/O). A fase aquosa contém o material a ser encapsulado e a fase oleosa é formada por um solvente orgânico, geralmente éter etílico. Uma vez obtida a emulsão, efetua-se a evaporação do solvente orgânico. Desta forma, obtém-se os lipossomas que apresentam um grande compartimento aquoso interno, e são geralmente do tipo *Large Unilamellar Vesicles* (LUV).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O ágar, a triptona e o extrato de levedura foram adquiridos da ISOFAR (Petrópolis, RJ, BRASIL). O cloreto de sódio, o éter etílico e o hidróxido de sódio foram obtidos da VETEC QUÍMICA FINA LTDA (Duque de Caxias, RJ, BRASIL). O IPTG (isopropiltioglicosídeo); o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo); o padrão 1 kb DNA Plus e o Kit "CONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System" foram adquiridos da GIBCO™ (New York, EUA). A suspensão de *Escherichia coli* DH5 α foi adquirida da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). A ampicilina foi obtida da Fisher Scientific (New Jersey, EUA). O plasmídeo pGEM-T e o padrão Lambda DNA/EcoRI-HindIII foram adquiridos da Promega (Madison, EUA). A 6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina (β -CD⁺) foi adquirida da Cyclolab R&D Laboratory (Budapeste, Hungria). A 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) foi gentilmente cedida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O hemisuccinato de colesterila (CHEMS), a N-2-hidroxietilpiperazina (HEPES) e o tampão tris-(hidroximetil)aminometano (Tris) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA). As membranas de policarbonato foram adquiridas da MILLIPORE (Bedford, EUA).

2.2. PREPARO DE PLACAS DE PÉTRI CONTENDO O MEIO LB-ÁGAR

1,5 g de ágar foram dissolvidos em 100 mL do meio LB pH 7,4 (2,0 g de triptona, 1,0 g de extrato de levedura, 1,0 g de NaCl). Em seguida, o meio LB-Ágar foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Após o resfriamento do meio, adicionou-se ao mesmo 40 µL de IPTG 100 mM, 100 µL de ampicilina (50 mg/mL) e 160 µL de X-Gal (40 mg/mL) e esta mistura foi distribuída em placas de Petri (DAVIS *et al.*, 1986).

2.3. OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Jorge Luiz Pesquero e a Profa. Wânia da Silva Carvalho, do Laboratório de Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas e do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, respectivamente. O plasmídeo comercial pGEM-T de aproximadamente 3 kb, contendo o gene Lac-Z (Figura 5), responsável pela expressão da enzima β -galactosidase (β -Gal), foi amplificado utilizando-se colônias de *E. coli* DH5 α . Inicialmente, 100 µL de *E. coli* DH5 α foram misturados a 1 µg da solução de pGEM-T e esta mistura foi submetida a resfriamento em banho de gelo por 30 minutos, seguido de aquecimento a 42°C por 30 segundos e, novamente, resfriamento em banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, 400 µL do meio LB pH 7,4 foram adicionados à suspensão de bactérias e estas foram incubadas a 37°C em THERMOMIXER 5436 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por aproximadamente 2 horas ou até o turvamento do meio. Em

seguida, a suspensão de bactérias foi plaqueada em meio LB-Ágar e mantida sob incubação a 37°C por aproximadamente 16 horas. Para a extração do plasmídeo pGEM-T a partir das bactérias competentes, 200 mL do meio LB foram preparados e esterilizados à 121°C por 15 minutos e após o resfriamento, 100 µL de ampicilina 0,1 mg/mL foram adicionados ao mesmo. Em seguida, uma colônia de *E. coli* DH5α foi transferida para esse meio, sendo incubada pernoite à 37°C, sob agitação em agitador orbital (TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O plasmídeo foi purificado empregando-se o sistema “Concert High Purity Plasmid Maxiprep System”. A concentração do DNA plasmidial foi determinada por espectrofotometria (Hitachi Instruments, Illinois, EUA) a 260 nm. A pureza do DNA plasmidial foi avaliada mediante a determinação da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda a 260 e 280 nm, respectivamente. Além disto, foi também realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) para a confirmação de obtenção e da pureza do DNA plasmidial.

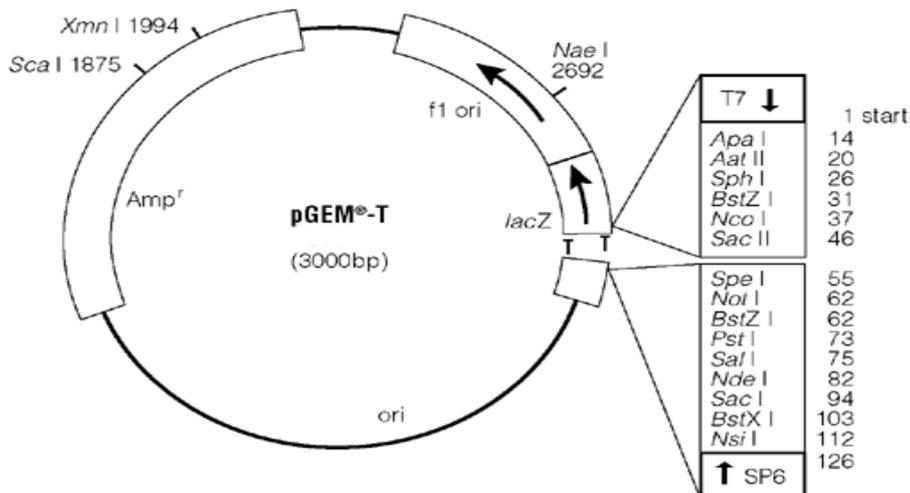


Figura 5- Esquema do plasmídeo pGEM-T.

2.4. OBTENÇÃO DO COMPLEXO β -CD⁺/DNA

Visando-se obter uma eficaz complexação entre as moléculas de β -CD⁺ e as de DNA, foram misturadas quantidades variáveis de β -CD⁺ com o plasmídeo pGEM-T em concentração constante e igual a 10,4 μ g/mL, de modo a se obter as seguintes relações de carga: +2/-, +/-, +2-,+4-, +8- e +16-. A avaliação da formação do complexo β -CD⁺/DNA foi feita utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) , empregando-se como referência o padrão 1 kb DNA Plus.

2.5. ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO β -CD⁺/DNA EM LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS

A encapsulação do complexo β -CD⁺/DNA em lipossomas pH-sensíveis foi realizada através do emprego do método de evaporação em fase reversa (NEW, 1990).

2.5.1. Método de evaporação em fase reversa

2.5.1.1. Obtenção de uma emulsão A/O

Alíquotas clorofórmicas de DOPE e CHEMS (concentração lipídica total igual a 20 mM, razão molar igual a 6:4, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o solvente, em seguida, evaporado sob vácuo. O filme lipídico obtido foi dissolvido em 3,0 mL de éter etílico, previamente tratado com solução tampão de HEPES 10 mM para eliminação de peróxidos e contendo quantidade de NaOH necessária para ionizar completamente o CHEMS.

Posteriormente, 1,0 mL da solução contendo o complexo β -CD⁺/DNA em tampão Tris pH 7,4 foi transferido à essa solução lipídica, de forma que a concentração de DNA foi igual a 25 ou 50 μ g/mL. A mistura obtida foi, então, submetida ao vórtex (IKA, Wilmington, NC, EUA) durante 5 minutos, produzindo uma emulsão do tipo A/O (água/óleo).

2.5.1.2. Obtenção dos lipossomas

A emulsão A/O foi submetida à evaporação sob vácuo (ROTAVAPOR FISATOM, São Paulo, Brasil) a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas. Em seguida, os lipossomas foram submetidos à calibração mediante sua passagem por membranas de policarbonato de 0,4 μ m (5 vezes) e 0,2 μ m (5 vezes). O complexo β -CD⁺/DNA não encapsulado foi separado dos lipossomas mediante ultracentrifugação (Ultracentrífuga SORVALL Ultra 80, Albertville, Minnesota, EUA) à 150000Xg, à 4°C, durante 80 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção do DNA plasmidial

Após transformação das colônias de *E. coli* DH5 α com o plasmídeo pGEM-T, constatou-se que tais colônias apresentavam coloração azul (Figura 6), sendo isto o indicativo de que houve a inserção do plasmídeo no interior das bactérias. O plasmídeo em questão contém o gene Lac-Z responsável pela expressão da

enzima β -galactosidase, cuja função é a de catalisar a conversão da molécula de lactose em unidades de glicose e galactose; sendo que esta enzima também reconhece como substrato a molécula de X-Gal, já que há semelhança estrutural entre esta última e a lactose .

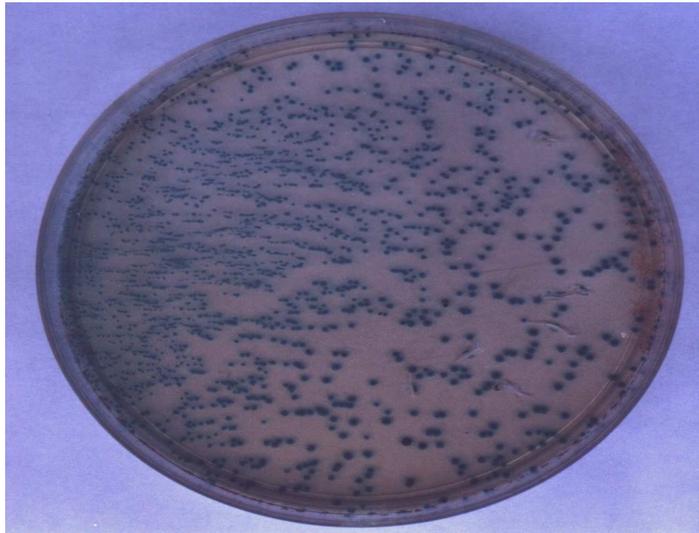


Figura 6 - Placa de petri contendo as colônias de *E. coli* DH5 α após o procedimento de transformação e crescimento.

Para a purificação do DNA plasmidial, foi utilizado o kit maxiprep. Através deste, há a possibilidade de separação das moléculas do plasmídeo de outras moléculas oriundas das colônias de *E. coli*, como proteínas, RNA's e o próprio DNA bacteriano. Este procedimento fundamenta-se no uso de uma resina de troca iônica, que promove a purificação do DNA plasmidial em níveis equivalentes à duas passagens através de um gradiente de CsCl. Após um procedimento de alcalinização do meio para separar o DNA de interesse daquele pertencente às bactérias (DNA genômico), o material é eluído através de uma coluna carregada

positivamente, de forma que ocorre uma interação eletrostática entre a carga negativa do plasmídeo e a positiva presente na superfície da resina. Inicialmente, a coluna é eluída com tampão contendo 800 mM de NaCl e 100 mM de acetato de sódio (pH 5,0), o que permite a retirada de RNA, proteínas, carboidratos e outras impurezas. Na etapa seguinte, o plasmídeo pGEM-T é eluído utilizando-se tampão composto por 1,25 M de NaCl e 100 mM de Tris-HCl (pH 8,5), pois a alta concentração de sais influencia na ligação do DNA à coluna, levando à sua eluição da mesma. Após a extração e purificação do plasmídeo pGEM-T, sua concentração foi medida em espectrofotômetro a 260 nm. A pureza do DNA plasmidial foi determinada pela razão entre as absorvâncias obtidas a 260 nm ($\bar{A}1$) e 280 nm ($\bar{A}2$), uma vez que estes comprimentos de onda são específicos para ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente. A quantidade total de DNA plasmidial obtida nos diferentes experimentos foi de aproximadamente 200 μ g. As razões $\bar{A}1/\bar{A}2$ mostraram valores compreendidos entre 1,6-1,8, indicando o baixo nível de contaminação protéica no DNA de interesse (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Além disto, a pureza do plasmídeo pGEM-T foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), sendo utilizado como referência o padrão Lambda DNA/EcoRI-HindIII. A Figura 7 mostra o gel obtido, confirmando que a banda referente ao plasmídeo pGEM-T possui aproximadamente 3 kb.

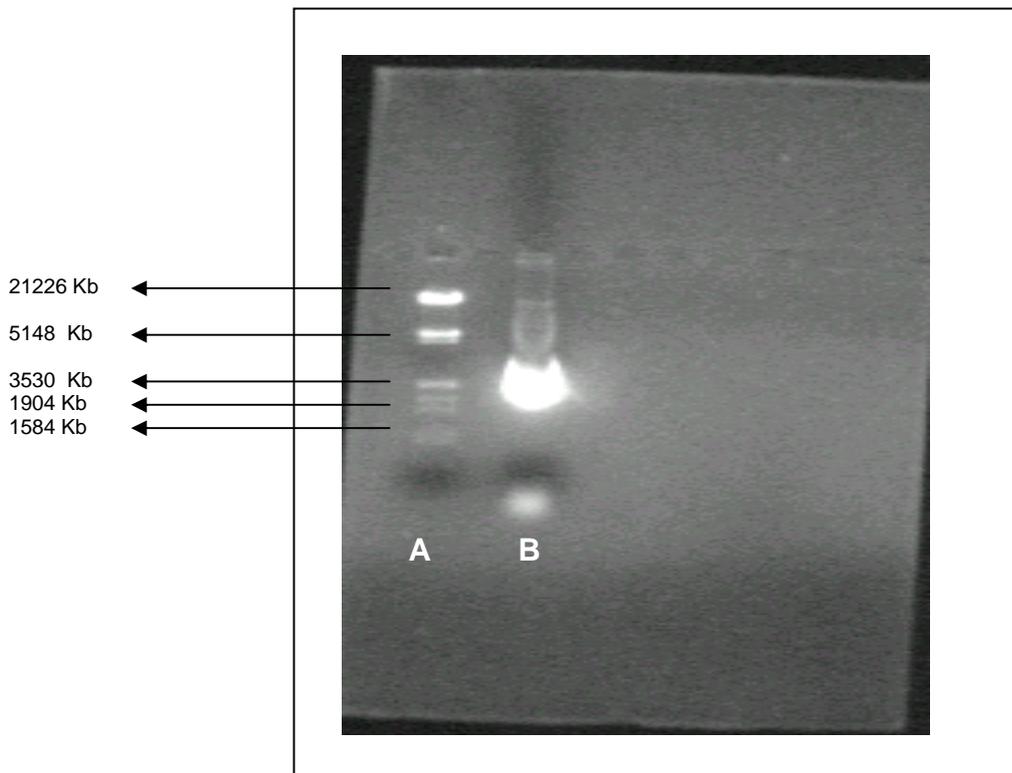
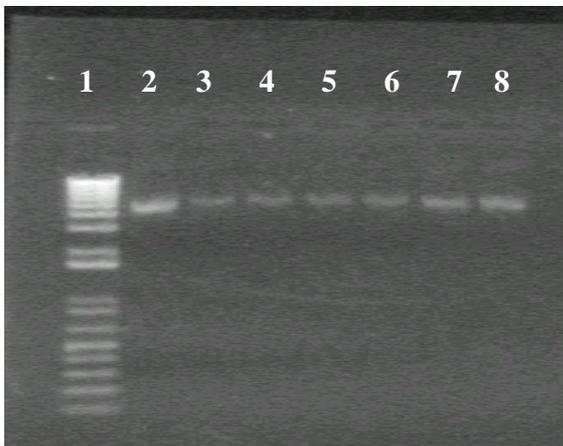


Figura 7 – Gel de agarose contendo o padrão Lambda DNA/EcoRI-HindIII (A) e o plasmídeo pGEM-T (B)

3.2. AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO β -CD⁺/DNA

A avaliação do grau de complexação entre a β -CD⁺ e o pGEM-T foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), sendo que a formação do mesmo ocorre devido às interações eletrostáticas entre ambos. Pela Figura 8, pode-se observar que em presença de quantidades excessivas de carga negativa (+/16- e +/8-) há uma maior intensidade nas bandas de DNA livre. Porém, a intensidade desta

banda diminui à medida que a razão de cargas torna-se menos negativa. Isto indica que realmente há a ocorrência da complexação entre a ciclodextrina catiônica e o DNA, sendo que esta complexação torna-se mais efetiva em presença de altos níveis de carga positiva. Portanto, para a encapsulação do complexo β -CD⁺/DNA em lipossomas pH-sensíveis, foi utilizado o complexo apresentando a razão de carga igual a +/-, uma vez que neste caso há uma menor intensidade na banda do DNA, indicando uma maior complexação.



- 1 - Padrão 1kb DNA plus
- 2 - DNA livre
- 3 - CD/DNA 2+/-
- 4 - CD/DNA +/-
- 5 - CD/DNA +/2-
- 6 - CD/DNA +/4-
- 7 - CD/DNA +/8-
- 8 - CD/DNA +/16-

Figura 8 – Gel de agarose contendo o complexo β -CD⁺/pGEM-T em diferentes razões de carga.

II. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

1. INTRODUÇÃO

A eficiência de transfecção de vetores sintéticos está relacionada às estruturas formadas resultantes das interações entre as moléculas de DNA e dos componentes dos sistemas utilizados como carreadores (RADLES *et al.*, 1997; STERNBERG *et al.*, 1997). O tamanho e a carga superficial dos lipossomas utilizados como sistemas de liberação de genes têm influência direta em sua estabilidade física e na interação com as células (BIRCHALL *et al.*, 1999). Ainda, a quantidade de DNA encapsulada no interior destas vesículas é de fundamental importância para o sucesso da terapia gênica. Desta forma, o objetivo desta parte do trabalho foi o de caracterizar, do ponto de vista físico-químico e morfológico, o carreador de DNA desenvolvido. Para tanto, os lipossomas foram caracterizados com base em sua taxa de encapsulação, tamanho das partículas, potencial zeta bem como pela morfologia apresentada por essas vesículas e seus constituintes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

O PicroGreen foi adquirido da Molecular Probes (Eugene, EUA). O Triton X-100 foi obtido da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA). O cloreto de magnésio

foi adquirido da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, Brasil). O tampão TE [10mM Tris-HCl; 0,1mM EDTA, pH 8,0], foi adquirido da GIBCO™ (New York, EUA).

2.2. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO β -CD⁺/DNA EM LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS

A percentagem do complexo β -CD⁺/DNA encapsulado nos lipossomas pH-sensíveis foi determinada mediante a reação do DNA com o PicoGreen. O reagente PicoGreen complexa-se com o DNA livre, gerando um produto fluorescente, o qual foi excitado a 480 nm e a intensidade da fluorescência emitida a 520 nm foi determinada em espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian, Austrália). Para isto, uma solução estoque do complexo β -CD⁺/DNA, na concentração de 2 μ g/mL, foi preparada em tampão TE e o pH foi ajustado para 10 com solução de NaOH 0,1M. Neste pH, a β -CD⁺ encontra-se em sua forma não-ionizada, o que impede a sua complexação com o DNA plasmidial, permitindo assim a reação do DNA com o reagente PicoGreen. Para a determinação da concentração de DNA encapsulado nos lipossomas pH-sensíveis foi feita uma curva padrão do complexo β -CD⁺/DNA, em tampão TE pH 10, com as concentrações de DNA iguais a 0, 10, 20, 40, 60 e 100 ng/mL. Posteriormente, amostras de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA, purificados ou não por ultracentrifugação e o sobrenadante foram dosados. No caso dos lipossomas, adicionou-se previamente o surfactante Triton X-100 para que houvesse a ruptura dos mesmos. A adição deste surfactante ao sobrenadante foi também realizada

para que as condições de análise fossem idênticas. Após a ruptura dos lipossomas, as amostras foram diluídas de forma a atender o intervalo da curva padrão. A concentração final de Triton X-100 nas amostras foi inferior a 0,1% v/v, a qual não interfere nas medidas de fluorescência. Em todos os casos, a leitura foi determinada 3 minutos após a adição do reagente PicoGreen.

A porcentagem de encapsulação (PE) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PE = \frac{[\text{DNA}] \text{ nos lipossomas purificados}}{[\text{DNA}] \text{ nos lipossomas não-purificados}} \times 100$$

2.3. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

2.3.1. Determinação do tamanho das partículas

A análise do tamanho das partículas foi efetuada por meio de espectroscopia de correlação de fóton utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra). Este método fundamenta-se no fato de que as partículas presentes no sistema estão em constante deslocamento, o que faz com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas, de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas também é mais lenta. A

espectroscopia por correlação do fóton (PCS, do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*), utiliza a taxa de mudança destas flutuações da luz para determinar a distribuição de tamanho das partículas (MALVERN INSTRUMENTS, 1996).

Para a realização das medidas foram utilizados aproximadamente 0,5 mL dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA, bem como dos lipossomas sem o referido complexo (denominados de lipossomas brancos), diluídos em 15 mL de tampão Tris pH 7,4, a fim de que se obtivesse a contagem adequada de partículas. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas e foram realizados em triplicata.

2.3.2. Determinação do potencial zeta

Para a determinação do potencial zeta das vesículas lipídicas, as medidas foram feitas em triplicata com a mesma preparação descrita no item 2.3.1, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments Ltda, Inglaterra) na temperatura de 25°C, a um ângulo de 90°.

O fundamento de tal método, parte do pressuposto de que na maioria das suspensões e também nas dispersões coloidais, as partículas dispersas na água têm uma carga adquirida pela adsorção específica de íons ou ionização dos grupos superficiais, quando presentes. Sendo assim, íons positivos ou negativos podem ser liberados para o meio, até que seja atingido um equilíbrio. Geralmente as superfícies carregadas tendem a atrair íons de carga oposta. Os íons mais

próximos da superfície da partícula permanecem ligados a ela quando se movimenta, enquanto que os íons que estão um pouco mais afastados serão constantemente substituídos por outros. O formato e tamanho da superfície da partícula podem ter efeitos na distribuição dos íons próximos a ela enquanto que forças eletrostáticas atuam nos íons mais distantes. Esta dicotomia favorece a possibilidade de existir uma dupla camada formada por uma camada mais interna e outra difusa, caracterizadas por comportamentos iônicos diferentes.

O potencial elétrico próximo à superfície da partícula decresce conforme a distância da superfície aumenta, chegando ao zero, conforme pode ser observado no diagrama da Figura 9. Uma partícula individual e seus íons mais associados movem-se através da solução como uma unidade e o potencial nas fronteiras desta unidade, ou seja, no plano de cisalhamento é conhecido como potencial zeta (MALVERN INSTRUMENTS, 1996; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

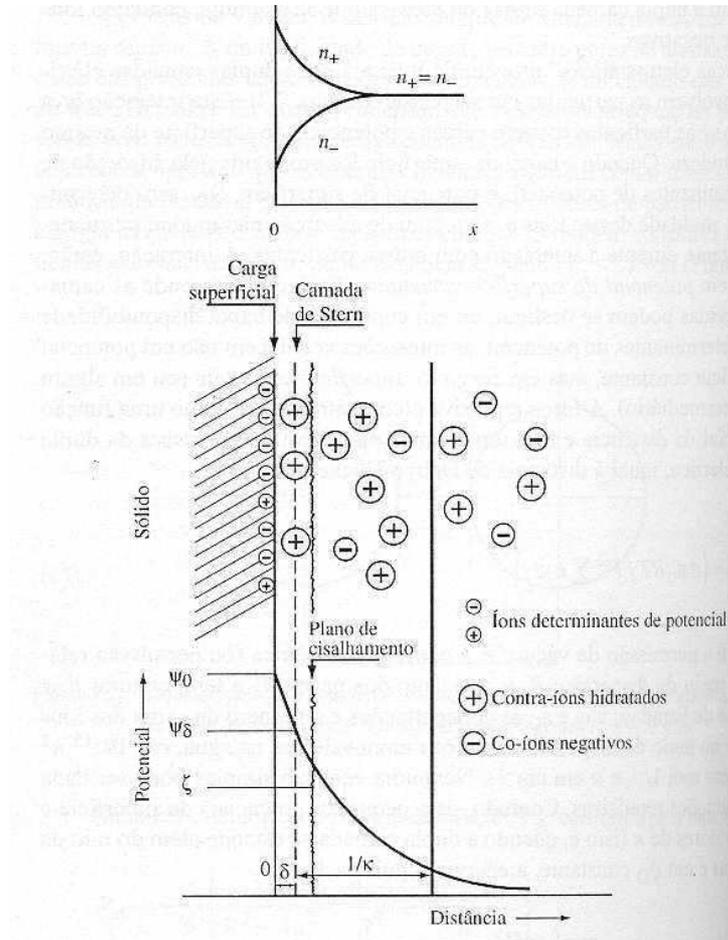


Figura 9 – Representação esquemática do potencial zeta de dispersões coloidais ou suspensões.

2.3.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Na microscopia de força atômica (AFM – do inglês, *Atomic Force Microscopy*) uma sonda extremamente fina ($\sim 100 \text{ \AA}$ de diâmetro na extremidade) varre a superfície da amostra em inspeção. A sonda é montada sobre a extremidade livre de uma alavanca que mede cerca de 100 a 200 μm de comprimento. Quando a sonda se aproxima da superfície da amostra, forças de

interação sonda-amostra surgem e fazem a alavanca defletir. Esta deflexão é monitorada por um detector à medida que a sonda varre a superfície, conforme ilustra a Figura 10.

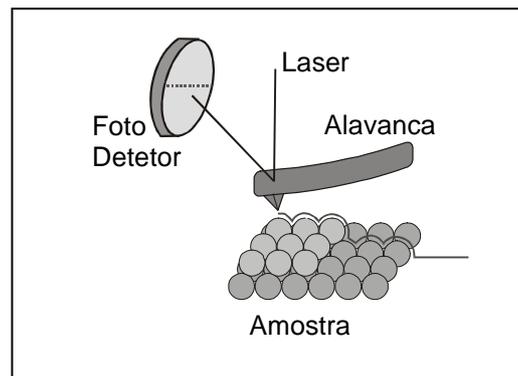


Figura 10 - Desenho esquemático do princípio de funcionamento da técnica de AFM. O fotodetector monitora a deflexão da alavanca durante a varredura através da mudança na reflexão de um feixe de laser incidente (adaptado de NEVES *et al.*, 1998).

Este sinal de deflexão da alavanca pode ser utilizado pelo computador para gerar um mapa da topografia da superfície da amostra, bastando fazer uma conversão da variação do sinal no detector para variação de altura na amostra. Estas imagens topográficas podem ser obtidas com a separação entre a sonda e a amostra constante ou com a força entre a sonda e a amostra constante. No primeiro método a sonda varre a superfície da amostra sempre com a mesma altura e a força entre elas varia. Neste método não é possível medir a variação da altura da amostra, isto é, o eixo z, e as imagens obtidas contém informação apenas nos eixos x e y. O método de força constante é mais utilizado, pois com ele é possível medir também a altura da amostra obtendo-se informações nos eixos x, y e z. Neste método determina-se uma força que se quer aplicar

constantemente sobre a amostra, ou seja, determina-se um valor do sinal que deve ser permanentemente observado pelo detector. O sistema operacional do computador, então, durante a varredura ajusta a posição vertical da amostra, através do “scanner” piezoelétrico, de maneira a manter a força, ou o sinal, no valor previamente determinado. A variação de altura no “scanner” corresponde exatamente à variação topográfica na amostra, e assim a morfologia da amostra é obtida. As forças de interação sonda-amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância sonda-amostra. A longas distâncias ($d > 1 \mu\text{m}$), praticamente não há qualquer interação. À medida que a sonda se aproxima da amostra ($d < 50 \text{ nm}$), forças atrativas passam a atuar entre a sonda e a amostra, tipicamente forças de *Van Der Waals*. A força atrativa aumenta com a aproximação da sonda, até que a separação seja da ordem da separação interatômica ($d \approx 0,5 \text{ nm}$). A partir deste ponto, fortes forças eletrostáticas repulsivas entre as nuvens eletrônicas das camadas de valência da sonda e da amostra passam a atuar, e a força resultante total passa a ser repulsiva. Nesta região, diz-se que a sonda está em contato físico com a superfície da amostra. Conforme o caráter da interação, atrativo ou repulsivo, pode-se definir alguns modos de operação da técnica de AFM, tais como:

- Não-Contato, onde a interação sonda-amostra é atrativa;
- Contato, com interação repulsiva;
- Contato intermitente, onde o regime ora é atrativo, ora é repulsivo.

No contato intermitente a sonda oscila sobre a superfície da amostra, tocando-a periodicamente. O modo contato permite ter imagens com altíssima resolução, a nível atômico, mas o atrito entre a sonda e a amostra pode danificar a

superfície, caso ela seja macia, produzindo uma imagem distorcida. O modo não-contato apresenta a vantagem de não danificar a amostra, pois a princípio, não há contato físico com a sonda, porém a resolução normalmente fica limitada a algumas dezenas de nanômetros, que é a distância sonda-amostra. O modo de contato intermitente reúne vantagens dos dois modos anteriores. Como há contato físico entre a sonda e a amostra, consegue-se altas resoluções (~ 1 nm). Porém, como a movimentação é feita com a sonda no ar, as forças de atrito entre a sonda e a amostra são grandemente reduzidas, eliminando os problemas de deformação da amostra presentes no modo contato. Vale ressaltar que as forças envolvidas na técnica de AFM não dependem da amostra ser condutora ou não. Assim, a microscopia de força atômica se aplica igualmente bem às amostras condutoras e/ou isolantes. As imagens são tridimensionais, obtendo-se as informações nas três direções espaciais, possibilitando a reconstrução exata dos aspectos morfológicos da superfície da amostra. Uma outra grande vantagem da microscopia de força atômica é a simplicidade de preparo da amostra, já que não é necessário vácuo durante a operação e a amostra não necessita ser condutora. Desta forma, a análise pode ser feita diretamente na amostra hidratada. Compostos biológicos podem ser preparados pela simples deposição de uma gota em uma lâmina ou em substrato de mica (NEVES *et al.*, 1998).

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Margareth Spangler Andrade e o Dr. José Mário Carneiro Vilela, ambos do Laboratório de Nanoscopia da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. A microscopia de força atômica foi realizada utilizando o equipamento Dimension 3000 com um controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EUA),

no modo de contato intermitente, utilizando sondas de silício de comprimentos de 122 μm e 228 μm , com freqüências de 297-380 KHz e 75-98 KHz, e constantes de força de 30-60 N/m e 3-7 N/m, respectivamente. Aproximadamente 10 μL das amostras foram depositados em mica [ou muscovita - $[\text{KAl}_2(\text{OH})_2\text{AlSi}_3\text{O}_{10}]$] recentemente clivada, já que este mineral apresenta superfície atômica plana e com plano basal de clivagem muito fácil, permitindo rápida limpeza e preparação deste substrato (ANDRADE *et al.*, 1998).

Primeiramente, foram analisados os componentes dos lipossomas (DOPE e CHEMS) separadamente; bem como a mistura física formada entre estes dois compostos. Posteriormente, analisou-se o DNA plasmidial, a $\beta\text{-CD}^+$ e o complexo $\beta\text{-CD}^+/\text{DNA}$. Finalmente, imagens dos lipossomas pH-sensíveis contendo ou não o complexo $\beta\text{-CD}^+/\text{DNA}$ foram obtidas. O excesso de umidade das amostras foi retirado com o uso de um fluxo de argônio.

No caso da amostra preparada para a visualização da morfologia do plasmídeo, a mica recém-clivada foi tratada previamente com solução de cloreto de magnésio 10mM, como mostra a Figura 11. Tal tratamento torna-se necessário uma vez que, sendo a superfície da mica carregada negativamente, deve-se utilizar íons positivos para aumentar a afinidade entre a superfície da mica e as moléculas de DNA (SHIMADZU APPLICATION NEWS, 1999). A varredura foi efetuada em uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels. A força da sonda foi minimizada para evitar mudanças estruturais nas amostras. A análise das imagens foi efetuada utilizando o programa *Section Analysis* do equipamento.

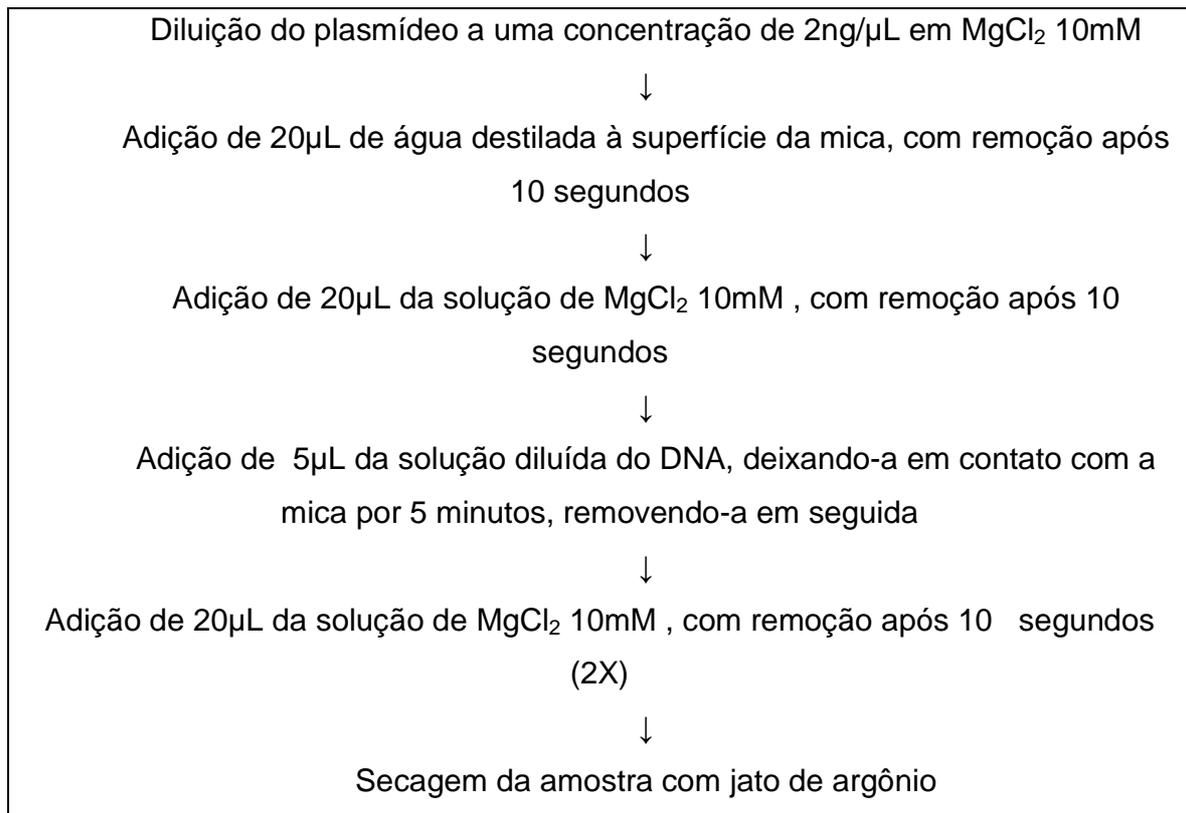


Figura 11 – Esquema do tratamento prévio da mica para a obtenção da imagem do DNA plasmidial (SHIMADZU APPLICATION NEWS, 1999 - modificado).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DA TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO β -CD⁺/DNA EM LIPOSSOMAS ANIÔNICOS PH-SENSÍVEIS

Para a determinação da taxa de encapsulação do complexo β -CD⁺/DNA nos lipossomas, foram comparadas formulações contendo 25 e 50μg/mL de DNA. Os resultados estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1- Avaliação da taxa de encapsulação do complexo β -CD⁺/pGEM-T em lipossomas aniônicos pH-sensíveis*

Concentração de DNA (μ g/mL)	Taxa de encapsulação (%)	Concentração de DNA encapsulado (μ g/mL)
25	45.4 \pm 2.5	10.7 \pm 0.9
50	27.6 \pm 1.2	14.4 \pm 1.3

* Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=3)

Estes resultados indicam que a taxa de encapsulação torna-se menor na medida em que a concentração de DNA é aumentada. No entanto, a concentração de DNA encapsulada em ambas situações é equivalente. Isto sugere que a capacidade de encapsulação máxima dos lipossomas foi atingida com o uso da menor concentração inicial de DNA. Desta forma, optou-se por prosseguir os estudos a partir da formulação de lipossomas contendo 25 μ g/mL, principalmente devido ao custo; já que um carreador sintético para aplicação em terapia gênica, além de eficaz e atóxico, deve também apresentar um custo efetivo para produção em larga escala (LEE *et al.*, 2002).

3.2. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS

Após o procedimento de purificação descrito no item 2.5.1.2, formulações de lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA, bem como lipossomas brancos, foram analisados quanto ao tamanho e potencial zeta.

A Tabela 2 apresenta os valores do diâmetro e homogeneidade das partículas assim como do seu potencial zeta.

Tabela 2 – Determinação do diâmetro e potencial zeta dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão (ip)	Potencial Zeta (mV)
Lipossoma branco	160,0 ± 7,5	0,20 ± 0,14	-55,0 ± 5,4
Lipossoma contendo o complexo β-CD ⁺ /DNA	186, 0 ± 5,6	0,11 ± 0,02	-56,0 ± 3,7

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Comparando-se os valores apresentados na tabela acima, pode-se observar o maior diâmetro obtido para os lipossomas contendo o complexo β-CD⁺/DNA. Isto indica a ocorrência da encapsulação do mesmo no interior das vesículas. Os valores encontrados para o índice de polidispersão indicam que a formulação contendo o complexo β-CD⁺/DNA apresenta partículas com maior homogeneidade em comparação aos lipossomas brancos, o que contribui para a estabilidade e eficiência destes carreadores para utilização como vetores de transfecção (LIU; HUANG, 2002; KUO *et al.*, 2005). Ainda, a obtenção de valores de potencial zeta similares para os lipossomas brancos e aqueles contendo o complexo β-CD⁺/DNA sugere que este encontra-se encapsulado no interior das vesículas e não adsorvido à sua superfície. A adsorção do complexo β-CD⁺/DNA à superfície dos lipossomas resultaria em valores de potencial zeta menos negativos.

3.3. Análise morfológica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis e de seus componentes

Os componentes dos lipossomas pH-sensíveis (DOPE e CHEMS) foram analisados obtendo-se as imagens apresentadas na Figura 12. Na Figura 12a, pode-se perceber que as moléculas do CHEMS apresentam topografia relativamente plana, formando uma camada homogênea sobre a superfície da mica, a qual apresenta uma espessura igual a 0,5 nm. A figura 12b mostra que as moléculas de DOPE apresentam-se agrupadas e com superfície topográfica um pouco mais pronunciada e de espessura igual a 1,5 nm. A mistura de DOPE e CHEMS levou ao aparecimento de bicamadas na superfície da mica, a qual apresenta uma altura regular de aproximadamente 5,3 nm (Figura 12c). Esta organização supramolecular é possivelmente resultante das repulsões eletrostáticas existentes entre os grupamentos carboxílicos e fosfato presentes no CHEMS e DOPE, respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998).

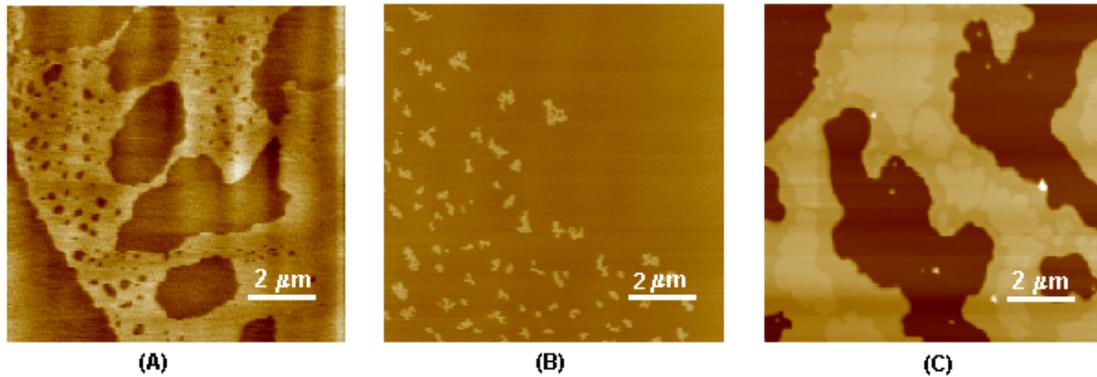


Figura 12 – Imagens topográficas de microscopia de força atômica do CHEMS (a), DOPE (b) e da mistura física DOPE/CHEMS (c) sobre uma superfície de mica. DOPE e CHEMS foram misturados na mesma razão molar empregada no preparo dos lipossomas pH-sensíveis (concentração lipídica total igual a 20mM; razão molar 6:4, respectivamente).

Posteriormente, foram analisadas amostras contendo o plasmídeo pGEM-T, a β -CD⁺ e o complexo formado entre estas duas estruturas (Figura 13). Pode-se observar que o DNA plasmidial apresenta-se na forma circular com superfície topográfica acentuada e diâmetro médio de 500 nm (Fig. 13a). As moléculas de β -CD⁺ organizam-se na forma de agregados sobre a superfície da mica (Figura 13b). Examinando-se as imagens obtidas a partir do complexo formado entre a β -CD⁺ e o plasmídeo pGEM-T, na razão de carga igual a +/8-, percebe-se que não há a total complexação destas substâncias, já que é possível visualizar a estrutura do DNA plasmidial sob sua forma livre (Figura 13c). Porém, o complexo formado na razão de carga igual a +/-, apresenta morfologia diferente daquelas apresentadas para o DNA plasmidial (estrutura circular) e para a β -CD⁺ (Figura 13b). Estas estruturas mostram-se muito sensíveis à força

exercida pela sonda do equipamento e apresentam-se como pequenas esferas e estruturas em forma de anel que se interconvertem em resposta às variações na força da referida sonda. Um aumento na força da sonda ocasiona a formação de anéis a partir das esferas e com a redução da mesma observa-se o retorno da formação das esferas (Figura 13d). Portanto, atribuímos estas estruturas esferas/anéis como sendo resultantes da formação do complexo β CD⁺/DNA. Evidência adicional da formação deste complexo é o diâmetro destas estruturas, o qual é 10 vezes menor do que aquele observado para o DNA plasmidial sob sua forma livre. Esta redução de tamanho deve-se, possivelmente, à compactação ocasionada a partir das interações eletrostáticas atrativas entre o DNA e a β CD⁺, a qual é importante para a eficiência de transfecção (MAHATO *et al.*, 1999). No estudo realizado por CRYAN e colaboradores (2004), o plasmídeo pCMV*luc* é complexado com a heptakispiridilamino- β -ciclodextrina e as imagens obtidas por microscopia eletrônica do referido complexo são similares. Este complexo apresentou a forma de pequenos “anéis”, sendo denominados de “partículas em forma de toróide”.

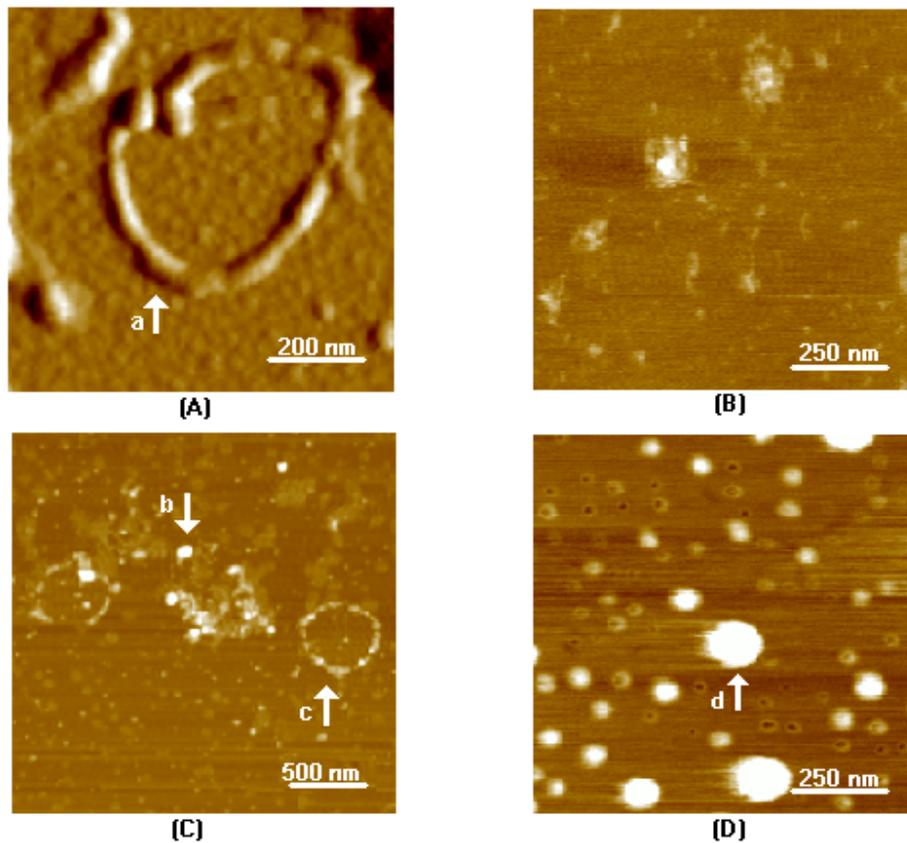


Figura 13 –Imagens topográficas de microscopia de força atômica do DNA plasmidial (A), da β -CD⁺ (B), do complexo β -CD⁺/DNA +8/- e do complexo β -CD⁺/DNA +/- sobre a superfície da mica. As setas a e c indicam o DNA plasmidial sob sua forma livre; b e d representam o complexo β -CD⁺/DNA e a formação de aglomerados, respectivamente.

Finalmente, a morfologia dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo ou não o complexo β CD⁺/DNA foi analisada (Figura 14 a e b, respectivamente). No caso dos lipossomas contendo o complexo β CD⁺/DNA, as imagens revelam uma maior homogeneidade do diâmetro das vesículas quando comparados aos lipossomas denominados brancos. Além disto, pode-se observar nas imagens dos lipossomas sem o complexo β CD⁺/DNA, a presença de estruturas “achatadas”

com altura média de 5nm, o que é compatível com a espessura da bicamada lipídica observada na Figura 12c. Isto sugere a fusão das vesículas lipídicas como demonstrado por JAAS e colaboradores (2000). Nesse estudo, lipossomas compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e colesterol, na razão molar de 40:25:20:5, respectivamente, tiveram sua morfologia analisada por microscopia de força atômica, utilizando o equipamento Nanoscope IIIa. Estes lipossomas após serem depositados sobre a mica apresentaram uma morfologia tipo esferas que com o passar do tempo se transformaram em estruturas achatadas, e por fim, em bicamadas e/ou monocamadas lipídicas. Isto não foi observado no caso dos lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo β CD⁺/DNA, o que sugere que a presença deste contribui para a estabilidade das vesículas.

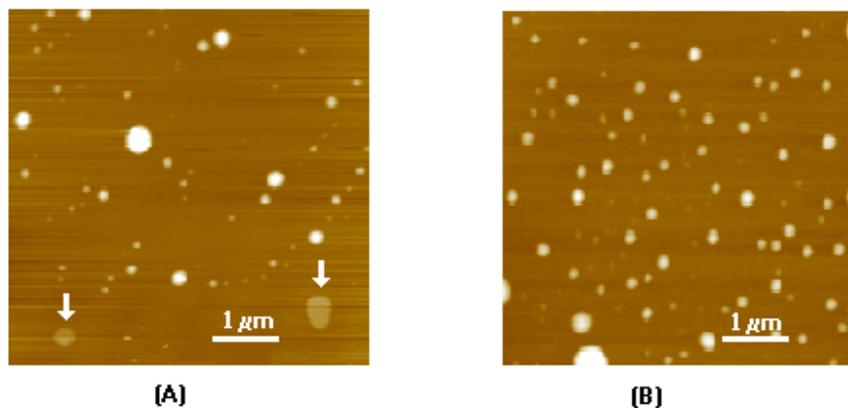


Figura 14 - Imagens topográficas de microscopia de força atômica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis sem (A) e com o complexo β CD⁺/DNA (B). As setas em A indicam a presença de estruturas achatadas, caracterizando a formação de bicamadas lipídicas.

III. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

1. INTRODUÇÃO

Desde sua introdução por MOSMANN em 1983, a avaliação toxicológica *in vitro* utilizando o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, conhecido como sal de tetrazólio (MTT), demonstrou ser uma maneira rápida para a detecção da citotoxicidade ou da viabilidade celular a partir da exposição a substâncias tóxicas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). O MTT tem sido um dos métodos mais empregados para avaliar a citotoxicidade de carreadores de genes para liberação intracelular (LESAGE *et al.*, 2002; CRYAN *et al.*, 2004; MANSOURI *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2006; NIMESH *et al.*, 2006). O MTT é um sal amarelado, solúvel em água, o qual é convertido pela enzima succinil-desidrogenase mitocondrial a um composto insolúvel de coloração roxa, denominado de formazan. Este produto é dosado com o emprego de espectrofotometria na região do visível (BELLAMY, 1992). É importante ressaltar que apenas células viáveis são passíveis de realizar esta conversão enzimática (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Portanto, nossa proposta nesta parte do trabalho foi a avaliação da citotoxicidade da formulação de lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA, em diferentes concentrações, comparando-a ao produto comercial composto pelo lipídeo catiônico DOTMA (cloreto de N-[1-(2,3-

dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamônio e pelo fosfolípídeo DOPE (Lipofectin[®]), empregando-se o ensaio com o MTT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Meio de cultura, antibióticos e reagentes

O meio de cultura DEMEM Dulbecco's modificado suplementado com o fator de crescimento F12 (DMEM-F12), a solução dos antibióticos penicilina (5000 unidades/mL), estreptomicina (5000µg/mL) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da GIBCO TM – Invitrogen Corporation (Auckland, Nova Zelândia) . O sal de tetrazólio (MTT) e o azul de trypan foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA). A tripsina 0,25% (v/v) em EDTA foi obtida da CULTILAB (Campinas, SP, Brasil). O dimetilsulfóxido foi comprado da Synth (Diadema, SP, Brasil). O fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de potássio, cloreto de sódio, ácido clorídrico e o hidróxido de sódio foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O Lipofectin[®] foi adquirido da INVITROGEN (Carlsbad, Califórnia,EUA).

2.1.2. Linhagem celular

A linhagem celular CHO (células ovarianas de *hamster* chinês, do inglês, “*Chinese Hamster Ovary*”) foram gentilmente cedidas pelo professor Robson Augusto Souza dos Santos, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo do meio de cultura

O meio DMEM-F12 foi dissolvido em água purificada e acrescido de bicarbonato de sódio (3,7g/L) e dos antibióticos penicilina (5000 unidades/mL), estreptomicina (5000 µg/mL). O pH do meio foi ajustado para 7,4, utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 0,1 M. Posteriormente, o meio de cultura foi filtrado em membrana de nitrato de celulose de 0,22µm (Micro Filtration System-MFS, Dublin, CA, EUA). Finalmente, adicionou-se 10% de SFB estéril ao meio filtrado e este foi armazenado em frascos estéreis à temperatura de 4°C.

2.2.2. Preparo das soluções e dispersões

2.2.2.1. Preparo do tampão PBS pH 7,4

O tampão foi preparado dissolvendo-se fosfato de sódio dibásico (1,15g), fosfato monobásico de potássio (0,2g), cloreto de sódio (8,0g) e cloreto de

potássio (0,2g) em 100mL de água purificada. O pH da solução foi ajustado para 7,4 utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 0,1 M. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de nitrato de celulose de 0,22 μ m e armazenada em frascos estéreis à temperatura de 4°C.

2.2.2.2. Diluição dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA

Os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA foram diluídos em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB de forma que a concentração total de lípides foi igual a: 1×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} mmol/mL. A concentração do DNA plasmidial correspondente foi igual a: 6; 1,2; $1,2 \times 10^{-1}$; $1,2 \times 10^{-2}$; $1,2 \times 10^{-3}$; $1,2 \times 10^{-4}$; $1,2 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-6}$ μ g/mL, respectivamente.

2.2.2.3. Diluição do produto comercial Lipofectin[®]

A diluição do Lipofectin[®] foi realizada levando-se em consideração as instruções contidas no catálogo do produto. Em síntese, 109,2 μ L da solução estoque estéril de DNA a 0,1098 μ g/ μ L foram diluídos em 190,8 μ L de água destilada estéril. Posteriormente, esta solução diluída foi misturada à 240 μ L do Lipofectin[®]. Esta mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A fim de que as quantidades de DNA fossem equivalentes para ambas as

formulações de lipossomas, foram realizadas diluições do complexo resultante da interação entre os lipossomas catiônicos e o DNA plasmidial. Desta forma, através das referidas diluições foram obtidas as seguintes concentrações do plasmídeo pGEM-T: 6; 1,2; $1,2 \times 10^{-1}$; $1,2 \times 10^{-2}$; $1,2 \times 10^{-3}$; $1,2 \times 10^{-4}$; $1,2 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$. Portanto, a concentração total de lípides no produto em questão após as sucessivas diluições foi de: $1,71 \times 10^{-1}$; $0,34 \times 10^{-1}$; $0,34 \times 10^{-2}$; $0,34 \times 10^{-3}$; $0,34 \times 10^{-4}$; $0,34 \times 10^{-5}$; $0,34 \times 10^{-6}$ e $0,34 \times 10^{-7}$ mmol/mL .

2.2.3. Cultivo das células

As células foram cultivadas em meio DMEM-F12/10% FBS na presença dos antibióticos penicilina e estreptomicina, conforme descrito anteriormente. Foram utilizados frascos de 25 mL (Nunclon™, Nalge NUNC International, Dinamarca) e as células foram mantidas à temperatura de 37°C em estufa (Forma Scientific Marietta, Ohio, EUA) com atmosfera úmida contendo 5,0 % (v/v) de dióxido de carbono. No momento em que as células atingiram 100% de confluência, foi realizado o subcultivo para a ampliação da cultura: as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 e desprendidas da superfície do frasco de cultivo com 0,5mL da solução de tripsina 0,25% (v/v) em EDTA. Em seguida, foram adicionados 4,5mL do meio de cultura suplementado com 10% de SFB para a inativação da tripsina e a suspensão celular foi transferida para um frasco de 75mL (Nunclon™, Nalge NUNC International, Dinamarca). Para a manutenção das células viáveis em estoque, alíquotas de 1mL das culturas na fase de 100% de confluência,

contendo cerca de 10^6 células, acrescido de DMSO 10% (v/v) e 20% de SFB foram transferidas para tubos criogênicos de 1,8mL (Nunclon TM, Nalge NUNC International, Dinamarca) e, posteriormente, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

2.2.4. Medida da viabilidade celular com o emprego do azul de Trypan

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan. O fundamento deste método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade ao mesmo, exibindo coloração azul após tratamento (KONOPKA *et al.*, 1996).

A cultura de células em fase logarítmica de proliferação foi tripsinizada e transferida para tubo Falcon estéril de 15mL. Posteriormente, uma alíquota de 100 μ L da suspensão de células foi diluída em 100 μ L do corante e, após homogeneização, a solução obtida foi adicionada a um hematocítmetro (Boeco, Hamburgo, Alemanha). A contagem de células viáveis foi realizada em microscópio invertido (Zeiss, Minnessota, EUA), levando-se em consideração a média do número de células encontradas nos 4 quadrantes do hematocítmetro.

Para o cálculo do número de células/mL foi utilizada a seguinte equação:

$$NCV = \frac{NCNC \times FD \times 10^4}{4}$$

Onde:

NCV = número de células viáveis;

NCNC = número de células não coradas pelo azul de Trypan contadas em quatro quadrantes;

FD = fator de diluição

2.2.5. Avaliação da citotoxicidade

As culturas em fase logarítmica de proliferação foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 cavidades (Nalge Nunc International, Dinamarca), suspensas em 200µL do meio de cultura apropriado enriquecido com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5,0 % (v/v) de dióxido de carbono. O número de células/cavidade foi de $2,5 \times 10^3$, sendo a contagem realizada como descrito no item 2.2.4. Após 24 horas de cultivo, as células foram submetidas aos tratamentos específicos com lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA e Lipofectin[®]. Foi realizada a substituição do meio de cultivo contendo 10% de SFB por 200µL de cada uma das diluições. O controle foi realizado adicionando-se igual volume do referido meio de cultura e as células foram novamente incubadas *overnight* a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5,0 % (v/v) de dióxido de carbono. Após o período de

incubação, adicionou-se 200 μ L de meio de cultura contendo 10 % de SFB e 50 μ L da solução do sal de tetrazólio a 5mg/mL em cada cavidade da placa de cultivo. Após 4 horas, este meio foi removido e os cristais de MTT foram solubilizados em 200 μ L de DMSO. A leitura ótica foi realizada no comprimento de onda de 570nm (Espectrofotômetro Shimadzu UV Mini 1240, Columbia, Maryland, EUA). O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com os lipossomas em estudo foi realizado, a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle como 100% de viabilidade.

2.2.6. Análise estatística

A comparação entre as médias dos valores da % de viabilidade celular foi realizada empregando-se o Teste t de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de viabilidade das células CHO após tratamento com os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA e com o Lipofectin[®] encontram-se na Tabela 3. Ambas as formulações apresentaram efeitos citotóxicos apenas para aquelas diluições onde a concentração de DNA foi igual a 6 μ g/mL, pois os valores de densidade ótica foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) daqueles obtidos para o grupo controle. No caso dos lipossomas catiônicos, a toxicidade encontrada tem sido atribuída à alteração da permeabilidade da membrana celular resultante da interação eletrostática entre estes (ZHANG *et al.*, 2005).

Tabela 3 – Atividade citotóxica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA (LpS- β -CD⁺/DNA) em comparação ao Lipofectin[®] empregando-se células CHO.

Tratamento	Concentração total de lípides (mmol/mL)	Concentração de DNA (μ g/mL)	Densidade ótica (DO)	Viabilidade Celular (%)
Grupo controle ^a	-	-	0,860 \pm 0,014	100
LpS- β -CD ⁺ /DNA	1×10^{-2}	6	0,500 \pm 0,020	58,2
	2×10^{-3}	1,2	0,762 \pm 0,083	88,8
	2×10^{-4}	$1,2 \times 10^{-1}$	0,800 \pm 0,073	93,1
	2×10^{-5}	$1,2 \times 10^{-2}$	0,829 \pm 0,059	96,5
	2×10^{-6}	$1,2 \times 10^{-3}$	0,864 \pm 0,074	100,6
	2×10^{-7}	$1,2 \times 10^{-4}$	0,858 \pm 0,044	99,9
	2×10^{-8}	$1,2 \times 10^{-5}$	0,834 \pm 0,059	97,0
	2×10^{-9}	$1,2 \times 10^{-6}$	0,829 \pm 0,050	96,5
Grupo Controle ^b	-	-	0,793 \pm 0,038	100
Lipofectin [®]	$1,71 \times 10^{-1}$	6	0,448 \pm 0,058	56,5
	$0,34 \times 10^{-1}$	1,2	0,659 \pm 0,046	83,1
	$0,34 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	0,764 \pm 0,041	96,3
	$0,34 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$	0,807 \pm 0,020	101,7
	$0,34 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	0,805 \pm 0,030	101,5
	$0,34 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	0,780 \pm 0,014	98,4
	$0,34 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	0,770 \pm 0,026	97,2
	$0,34 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-6}$	0,797 \pm 0,039	100,5

^aGrupo controle utilizado no experimento referente ao tratamento das células com os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA.

^b Grupo controle utilizado no experimento referente ao tratamento das células com o Lipofectin[®].

Além disto, a toxicidade de alguns lípidos disponíveis comercialmente (incluindo o DOTMA, presente no Lipofectin[®]) parece estar relacionada ao fato destes lípidos não serem degradados no interior das células (PAUKKU *et al.*, 1997). No caso dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis, a maior toxicidade observada no primeiro ponto da diluição pode ser atribuída aos efeitos provocados pela presença do fosfolípido DOPE. Em estudo conduzido por FILION & PHILLIPS (1997) foi observado que a presença de DOPE pode levar a um aumento da toxicidade associada a diferentes formulações de lipossomas catiônicos. Utilizando células fagocíticas (macrófagos e a linhagem celular monocítica U937) e não-fagocíticas (Linfócitos T), foi avaliada a toxicidade de formulações de lipossomas compostas por dioleoiltrimetilamônio propano (DOTAP): DOPE, dimiristoiltrimetilamônio propano (DMTAP):DOPE, dipalmitoiltrimetilamônio propano (DPTAP):DOPE, diestearoiltrimetilamônio propano (DSTAP):DOPE e brometo de dimetiloctadecilamônio (DDAB):DOPE, na razão molar igual a 1:1. A ordem de toxicidade observada para as células fagocíticas foi: DOPE:DDAB > DOPE/DOTAP > DOPE:DMTAP > DOPE:DPTAP > DOPE:DSTAP. Sendo que para a linhagem não-fagocítica, efeitos tóxicos não foram detectados.

No nosso estudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e as demais concentrações de DNA para cada uma das formulações. Uma observação importante é o fato de que para ambas as formulações, na concentração de DNA igual à 1,2 µg/mL, não há o aparecimento de efeitos citotóxicos. Este dado sugere que os lipossomas desenvolvidos neste estudo

podem ser utilizados com segurança como possíveis carreadores de genes, uma vez que esta é a concentração de DNA usual empregada em avaliações de transfecção.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

ASPECTOS FARMACOTÉCNICOS DO DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

A utilização de ácidos nucleicos em terapia gênica é limitada devido a sua baixa penetração no interior celular e instabilidade nos fluidos biológicos (WU & WU, 1991; KAWAHATA *et al.*, 1995 MAHATO *et al.*, 1997a). Por isto, a utilização de carreadores é de extrema importância para o sucesso desta terapia. A utilização de lipossomas catiônicos tem se mostrado satisfatória para a liberação intracelular de genes, porém estes podem apresentar o inconveniente de serem citotóxicos (PAUKKU *et al.*, 1997). Assim, a encapsulação do material genético em lipossomas aniônicos pH-sensíveis pode ser interessante como alternativa à toxicidade relatada.

Para a obtenção deste novo vetor sintético, tornou-se necessário a complexação prévia do DNA plasmidial com 6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina. Desta forma, há uma neutralização da carga superficial do material genético, além de sua compactação, o que contribui para uma eficiente encapsulação no interior dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis. Portanto, inicialmente foi investigada a melhor relação de cargas entre estes dois componentes, a fim de que se obtivesse a menor quantidade possível de DNA livre. Com o emprego de eletroforese em gel de agarose, foi observado que a

partir da razão de carga +/- houve uma maior eficiência de compactação do DNA plasmidial. Evidência adicional da ocorrência da formação do complexo β -CD⁺/DNA foi a redução do diâmetro do plasmídeo pGEM-T por microscopia de força atômica. As imagens obtidas para o plasmídeo pGEM-T mostraram que este apresenta-se como uma estrutura circular de diâmetro médio de 500nm. Já as moléculas de β -CD⁺ apresentam-se sob a forma de aglomerados sobre a superfície da mica. As imagens obtidas para o complexo β -CD⁺/DNA, na razão de cargas igual a +/-, revelaram o surgimento de uma nova estrutura com forma esférica e diâmetro médio 10 vezes menor do que aquele apresentado pelo DNA plasmidial. Estas esferas interconverteram-se em estruturas em formas de anéis, na medida em que se aumentava a força exercida pela sonda do equipamento. No caso do complexo com razão de cargas igual a +/-8, observou-se uma complexação incompleta entre o DNA e a β -CD⁺, uma vez que foi como detectada a presença de plasmídeo sob sua forma livre por microscopia de força atômica. Esta observação confirmou o resultado encontrado previamente com o emprego de eletroforese em gel de agarose.

Após a obtenção do complexo β -CD⁺/DNA na razão de cargas ideal, este complexo foi encapsulado em lipossomas aniônicos pH-sensíveis, constituídos de DOPE:CHEMS (razão molar de 6:4) pelo método de evaporação em fase reversa. Após a formação dos lipossomas, foi avaliada a taxa de encapsulação do complexo β -CD⁺/DNA no interior destas vesículas. Para tanto, foram preparados lipossomas nos quais a concentração de DNA adicionada foi igual a 25 ou 50 μ g/mL. Foram encontrados os valores de taxa de encapsulação iguais a

45,4 ± 2,5 e 26,7 ± 1,2 para as concentrações de 25 e 50 µg/mL de DNA, respectivamente. Assim, os valores reais da quantidade do plasmídeo encapsulado nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis foram iguais a 10,7 ± 0,9 e 14,4 ± 1,3 µg/mL, respectivamente. Considerando-se que estas concentrações de DNA são equivalentes, pode-se supor que exista um limite máximo para a internalização do complexo β-CD⁺/DNA na cavidade aquosa das vesículas lipídicas. Desta forma, para a continuidade do estudo, optou-se por utilizar na preparação dos lipossomas a concentração de DNA igual a 25 µg/mL, o que permite reduzir o custo da preparação.

Posteriormente, os lipossomas aniônicos pH-sensíveis foram avaliados quanto ao diâmetro e potencial zeta. Os lipossomas contendo ou não o complexo β-CD⁺/DNA apresentaram um diâmetro médio igual a 186 e 160 nm, respectivamente. Este aumento de tamanho observado para os lipossomas contendo o complexo β-CD⁺/DNA indica a ocorrência da incorporação deste nas vesículas lipídicas. Comparando-se os índices de polidispersão obtidos para cada uma das formulações de lipossomas descritas acima, percebe-se uma maior homogeneidade de diâmetro das partículas para a formulação de lipossomas contendo o complexo β-CD⁺/DNA (i.p. = 0,20 ± 0,14 versus 0,11 ± 0,02, para os lipossomas brancos e para os lipossomas contendo o complexo β-CD⁺/DNA, respectivamente). Este fato pode ser explicado por uma possível estabilização adicional conferida aos lipossomas pelo complexo β-CD⁺/DNA, o que pode levar a uma maior rigidez da membrana destas vesículas. Outra evidência desta maior homogeneidade e estabilidade dos lipossomas contendo o complexo β-CD⁺/DNA

pôde ser observada por meio das imagens de microscopia de força atômica. Os lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA mostraram vesículas mais homogêneas e estáveis quando da sua deposição sobre a mica, sendo a altura destas vesículas de aproximadamente 23 nm (dado não mostrado). Em contraste, os lipossomas brancos têm uma distribuição mais heterogênea, além de apresentarem, em alguns campos, estruturas achatadas dispostas sobre a mica em detrimento à morfologia esférica típica dos lipossomas. Estas estruturas achatadas possuem altura de aproximadamente 5 nm, valor compatível com o determinado para as bicamadas resultantes da mistura física entre os componentes formadores dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis (DOPE e CHEMS). Este dado sugere que os lipossomas brancos são menos estáveis, com tendência a se depositarem sob a forma de bicamadas sobre a mica. Por outro lado, os lipossomas brancos apresentam altura igual a aproximadamente 19 nm.

Na determinação do potencial zeta das vesículas lipídicas, foram encontrados valores iguais a -55 e -56 mV para os lipossomas brancos e para aqueles contendo o complexo β -CD⁺/DNA, respectivamente. Estes valores permitem supor que o complexo β -CD⁺/DNA encontra-se encapsulado no interior das vesículas lipídicas e não adsorvidos à sua superfície. Caso ocorresse a referida adsorção, os valores de potencial zeta para os lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA seriam menos negativos. Além disto, outra evidência que sugere a encapsulação do complexo β -CD⁺/DNA nos lipossomas é a ausência das estruturas esferas/anéis, atribuídas ao complexo β -CD⁺/DNA, nas imagens dos lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA obtidas por microscopia de força atômica.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

A citotoxicidade dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA foi realizada *in vitro* com o emprego das células CHO e comparativamente a um tipo de lipossoma catiônico comercializado, Lipofectin[®]. As células CHO foram escolhidas devido a facilidade de serem transfectadas, e conseqüentemente, bastante empregadas em protocolos de transfecção (PATIL *et al.*, 2005b; PRASAD *et al.*, 2005). Avaliando-se os valores de densidade ótica obtidos para as duas formulações e comparando-os à densidade ótica do grupo controle, pôde-se perceber que em apenas uma das diluições houve o aparecimento de efeitos citotóxicos ($p < 0,05$). A concentração de DNA correspondente a esta diluição foi igual a 6 μ g/mL para ambas formulações. A citotoxicidade pode ser resultante da alta concentração de lípides para ambas as formulações em estudo. Em se tratando dos lipossomas catiônicos, o relato do aumento da toxicidade à medida que a razão de cargas lípide/DNA é incrementada encontra-se amplamente documentado (PATEL *et al.*, 2001). O possível mecanismo para explicar esta citotoxicidade parte do princípio de que lipossomas catiônicos alteram a permeabilidade da membrana celular por meio de interações eletrostáticas entre ambos (LIANG; HUGHES, 1998; CLARCK; HERSH, 1999). Além disto, a observação de que o DOTMA presente na formulação do Lipofectin[®] pode não ser biodegradado no interior das células apresenta relação com este efeito tóxico (PAUKKU *et al.*, 1997). No caso dos lipossomas aniônicos

pH-sensíveis, a citotoxicidade apresentada pode ser explicada pela elevada concentração de lipídes, uma vez que a β -CD⁺ encontra-se possivelmente no interior das vesículas, e portanto, não disponível para alterar a permeabilidade.

Por outro lado, comparando-se os valores da viabilidade celular para ambas as formulações diluídas de 5 a 5.000.000 de vezes em relação à primeira diluição, percebe-se que não há diferença estatisticamente significativa entre estes valores e aqueles apresentados pelos grupos controle. Este dado é particularmente importante devido ao fato de que em protocolos de transfecção, a quantidade de DNA sugerida é aquela correspondente a aproximadamente 1 μ g (PAUKKU *et al.*, 1997; KERNER *et al.*, 2001), sendo esta a quantidade presente na concentração de lipossomas aniônicos pH-sensíveis igual a 2×10^{-3} mmol/mL a qual apresentou 88,8% de viabilidade celular. Desta forma, pode-se supor que os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA podem apresentar segurança em relação à aplicação em protocolos de transfecção. No entanto, apesar do Lipofectin[®] não apresentar efeitos citotóxicos nas preparações mais diluídas, existem relatos de que embora os lipossomas catiônicos possam não apresentar resposta tóxica *in vitro* dentro de poucos dias após o tratamento, estes podem desencadear efeitos citotóxicos após um período de tempo mais prolongado. Portanto, talvez não tenha sido possível observar efeito citotóxico para a formulação de Lipofectin[®] em virtude do curto intervalo de tempo de observação. Desta forma, torna-se importante monitorar estes efeitos por períodos de tempo maiores (KANOPKA *et al.*, 1996).

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O objetivo desta dissertação de mestrado foi desenvolver lipossomas aniônicos pH-sensíveis como carreadores de DNA. Para tanto, efetuou-se a complexação prévia do DNA plasmidial com um derivado catiônico da β -ciclodextrina (6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina). Os lipossomas obtidos foram avaliados quanto às suas características físico-químicas e à sua citotoxicidade.

Primeiramente, pôde-se verificar que a melhor relação de cargas para a formação do complexo β -CD⁺/DNA foi igual a +/-, já que nesta razão de cargas há uma menor quantidade de DNA livre. Os lipossomas aniônicos pH-sensíveis constituídos por DOPE:CHEMS (razão molar de 6:4) apresentaram uma satisfatória taxa de encapsulação do DNA plasmidial e uma homogeneidade na distribuição do tamanho das vesículas. Além disto, a presença do complexo β -CD⁺/DNA no interior das vesículas parece contribuir com a estabilidade das mesmas. Em relação à citotoxicidade, os lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA apresentaram um perfil equivalente ao Lipofectin[®] frente às células CHO. Como perspectivas de continuidade do presente trabalho, faz-se necessário verificar a citotoxicidade dos lipossomas aniônicos contendo o complexo β -CD⁺/DNA frente à outras linhagens celulares assim como verificar a sua eficiência de transfecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, S., AGRAWAL, S. *In vivo* studies with antisense oligonucleotides. **Tips**, v.18, p. 12-18, 1997.

AKINC, A., LANGER, R. Measuring the pH environment of DNA delivery using non-viral vectors: implications for lysosomal trafficking. **Biotechnology Bioengineering**, 2002 (78) 503-508

ALMOFTI, M.R., HARASHIMA, H., SHINOHARA, Y., ALMOFTI, A., BABA, Y., KIWADA, H. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 246-253, 2003.

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.

BIRCHALL, J.C., KELLAWAY, I.W., MILLS, S.N. Physic-chemical characterization and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 195-207, 1999.

BYRNES, A.P., RUSBY, J.E., WOOD, M.J.A., CHARLTON, H.M. Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. **Neuroscience**, v. 66, p.1015-21, 1995.

CARACCILOLO, G., CAMINITI, R. Do Dc-Chol/DOPE-DNA complexes really form an inverted hexagonal phase? **Chemical Physics Letters**, v. 411, p.327-332, 2005.

CARPENTER, T. O., GERLOCZY, A., PITHA, J. Safety of parenteral hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 84, p. 222-225, 1995.

CLARK, P.R., HERSH, E.M. Cationic lipid-mediated gene transfer: Current concepts. **Current Opinions in Molecular Therapeutics**, v.1, p.158-176, 1999.

COLLINS, D. pH-Sensitive liposome as tools for cytoplasmic delivery, In: PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. **Liposomes as tools in basic research and industry**, CRC press, p. 201-214, 1995.

CORTESI, R., ESPOSITO, E., MENEGATTI, E., GAMBARI, R., NASTRUZZI, C. Effect of cationic liposome composition on *in vitro* cytotoxicity and protective effect on carried DNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 139, p. 69-78, 1996.

CRESPO, J., BLAYA, C., CRESPO, A., ALINO, S.F. Long-term expression of the human α 1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vectors. **Biochemical Pharmacology**, vol. 51, p. 1309-1314, 1996.

CROYLE, M. A., ROESSLER, B. J., HSU, C. P., SUN, R., AMIDON, G. L. B. Cyclodextrins enhance adenoviral-mediated gene delivery to the intestine. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1348-1355, 1998.

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

DAVIS LG, DIBNER MD, BATTEY JF. Basic Methods in Molecular Biology. New York: **Elsevier Science Publishing Co. Inc.**, p. 388, 1986.

DE LAPORTE, L., REA, J.C., SHEA, L.D. Design of a modular non-viral gene therapy vectors. **Biomaterials**, v. 27, p. 947-954, 2006.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1-14, 2003.

DELATTRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPOT, J.R., SCHUBERS, F. Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In: **Les liposomes Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques**. Paris: Les éditions, INSERM & Editions Médicales Internationales, p. 179-213, 1993.

DU, H., CHANDAROY, P., HUI, S.W. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surface inhibits protein adsorption and cell adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1326, n. 2, p. 239-248, 1997.

DUFÉS, C. UCHEGBU, I. F., SCHATZLEIN, A.G. Dendrimers in gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 57 (2005) 2177-2202.

DÜZGÜNEŞ, 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.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of controlled release**, V. 94, p. 1-14, 2004.

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

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

FILLION, M.C., PHILLIPS, N.C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1329 (1997) 345-356. (a)

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 oligonucleotides, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1515, p. 44-54, 2001. (b)

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Tradução: Zuleika Rothschild *et al.* 3. ed. São Paulo: Edusp, 2003. Título original: Physicochemical principles of pharmacy.

FOTAKIS, G. TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-77, 2006.

FREEMAN, D.J., NIVEN, R. N. The influence of sodium glycolate and others additives on the *in vivo* transfection of plasmid DNA in the lungs. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 202-209, 1996.

FROMMING, K. L., SZETLI, J. Cyclodextrins in Pharmacy. **Dordrecht: Klumer Academic Publishers**, 225 p., 1993.

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

GÓMEZ-HANS, A., FERNÁNDEZ-ROMERO, J.M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. **Trends in analytical chemistry**, v.25, n. 2, p. 167-178, 2006.

GOREN, D., HOROWITZ, A.T., ZALIPSKY, S. Targeting of stealth liposomes to erb- (Her/2) receptor: *in vitro* and *in vivo* studies. **British Journal of Cancer**, v.74, p. 1749, 1996.

HARRINGTON, K.J., ROWLINSON-BSZA, G., USTER, P.S. Stealth liposome encapsulated doxorubicin (SLED) and iododeoxyuridine (SLIUDR) as radiation sensitizers in head and neck squamous cell cancer xenograft tumours (HNSCCXT). **Proc. ASCO**, v. 17, p. 230, 1998.

HASEGAWA, S., HIRASHIMA, N., NAKANISHI, M. Comparative study of transfection efficiency of cationic cholesterol mediated by liposomes-based gene delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1299-1302, 2002.

LIONGTAO, Lv, SHUBIAO, Z., WANG, B., CUI, S., YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled release** 114 (2006) 100-109.

ISHIWATA, H., SUZUKI, N., ANDO, S., KIKUCHI, H., KITAGAWA, T. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 139-148, 2000.

KAMIYA, H., TSUCHIYA, H., YAMAZAKI, J., HARASHIMA, H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 153-164, 2001.

KANOPKA, K., PRETZER, E., FELGNER, P.L., DUZGUNES, N. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1312, p. 186-196, 1996.

KAWAHATA, K., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. **Pharmaceutical research**, V.12, p. 825-830,1995.

KERNER, M., MEYUAS, O., HIRSCH-LERNER, D., ROSEN, L.J., MIN, Z., BARENHOLZ, Y. Interplay in lipoplexes between type of pDNA promoter and lipid composition determines transfection efficiency of human growth hormone in NIH3T3 cells in culture. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1532, p. 128-136, 2001.

KHAW, B.A., DA SILVA, J., VURAL, I., NARULA, J., TORCHILIN, V.P. Intracytoplasmic gene delivery for in vitro transfection with cytoskeleton-specific immunoliposomes. **Journal of Controlled release**, v. 75, p. 199-210, 2001.

KONNO, H., YAMASHITA, A., TADAKUMA, T. Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant interleukin-2. Antitumor effect of IL-2 liposome. **Biotherapy**, v.3, p. 211-218, 1991.

KUO, J.H.S., JAN, M.S., CHANG, C.H., CHIU, H. W., LI, C.T. Cytotoxicity characterization of cationic vesicles in RAW 264.7 murine macrophage-like cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p. 189-196, 2005.

LAMPELA, P., SOININEN, P., URTTI, A., MÄNNISTÖ, P. T., RAASMAJA, A. Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonviral vectors. **International journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 175-184, 2004.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v.16, p. 307-321, 1998.

LECLERCQ, F., DUBERTRET, C., PITARD, B., SCHERMAN, D., HERSCOVICI, J. Synthesis of glycosylated polyethylenimine with reduced toxicity and high transfecting efficiency. **Bioorganic Medical Chemical Letters**. 2000 (10) 1233-1235.

LEE, R. J., HUANG, L. Lipid vector systems for gene transfer. **Critical Reviews™ in Therapeutical Drug Carrier Systems**, v. 14, p. 173-206, 1997.

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

LEOPOLD, P.L., FERRIS, B., GRINBERG, I., WOGALL, S. HACKETT, N. R., CRYSTAL, R.G. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells, **Human Gene Therapy**, v. 9, p. 367-378, 1998.

LESAGE, D., CAO, A., BRIANE, D., LIEVRE, N., COUDERT, R., RAPHAEL, M., SALZMANN, J.L., TAILLANDER, E. Evaluation and optimization of DNA delivery into gliosarcoma 9L cells by a cholesterol-based cationic liposome. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1564, p. 393-402, 2002.

LIANG, E., HUGHES, J. Characterization of a pH-sensitive surfactant, dodecyl-2-(1'-imidazolyl) propionate (DIP), and preliminary studies in liposome-mediated gene transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1369, p. 39-50, 1998.

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

LIU, Y., FONG, S, DEBS, R.J. Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. **Methods in Enzymology**, v. 373, p. 536-550, 2003.

LOFTSSON, T., BREWSTER, M. Applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85 p.1017-1025, 1996.

LUO,D., SLATZMAN, W.M. Synthetic DNA delivery systems. **National Biotechnology**, 2000 (18) 33-37.

MAHATO, R.I., TAKAKURA, M., HASHIDA, M. Development of targeted delivery systems for nucleic acid drug. **Journal of drug targeting**, v.4 p. 337-357, 1997. (a)

MAHATO, R.I., SMITH, L.C., ROLLAND, A. Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. **Advances in Genetics**, v. 41, p .95-156, 1999. (b)

MAHATO, R.I. Water insoluble and soluble lipids for gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 699-712, 2005. (c)

MALIK, S. T., MARTIN, D., HART, I. Therapy of human ovarian cancer xenografts with intraperitoneal liposome encapsulated muramyl-tripeptide phosphoethanolamine (MTP-PE) and recombinant GM-CSF. **British Journal of Cancer**, v. 63, p. 399-403, 1991.

MALVERN Instruments. **Zetasizer 1000/2000/3000 PCS Theory Manual** n. 0152, Inglaterra, 1996. (Manual equipamento).

MANSOURI, S., CUIE, Y., WINNIK, F., SHI, Q., LAVIGNE, P., BENDERDOUR, M., BEAUMONT, E., FERNANDES, J.C. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. **Biomaterials**, v. 27, p. 2060-2065, 2006.

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

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 & Molecular Biology Letters**, v. 7, p.923-927, 2002.

MUMPER, R.J., KLAKAMP, S.L. Polymeric gene delivery systems for in vivo gene therapy. **Drug Targeting and delivery**. 1999; 10 (Advanced Gene Delivery) 143-173.

NEVES, B.R.A.; ANDRADE, M. S.; VILELA, J.M.C. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâmica**, v.44, p.212-219, 1998.

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

NIMESH, S., KUMAR, R., CHANDRA, R. Novel polyallylamine-dextran sulfate-DNA nanoplexes: highly efficient non-viral vector for gene delivery. 2006. **International Journal of Pharmaceutics**.

Observation of plasmid DNA by SPM. **Shimadzu Application News**. N.D9. 1999

OKU, N. YAMAZAKI, Y., MATSUURA, M., MAYU, S. HASEGAWA, M., NANGO, M. A novel non-viral gene transfer system, polycation liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 209-18, 2001.

OLIVEIRA, M.C., BOUTET, V., FATTAL, E., BOQUET, D., GROGNET, J.M., COUVREUR, P., DEVERRE, J. R. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Sciences**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

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

ÖZER, A.Y., FARIVAR, M., HINCAL, A.A. Temperature and pH-sensitive liposome. **European J. Pharm. Biopharm.**, v.39, n.3, p. 97-101, 1993.

PARK, J.W., HONG, K., CARTER, P. Development of anti-p185^{HER2} imunoliposomes for cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 1327-1331, 1995.

PATEL, M., VIVIEN, E., HAUCHECORNE, M., OUDRHIRI, N., RAMASAWMY, R., VIGNERON, J.-P., LEHN, P. LEHN, J.-M. Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, p. 536-543, 2001.

PATIL, S.D., RHODES, D.G., BURGESS, D.J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive Review. **The AAPS Journal** 2005; 7 (1) 61-77. 2005. (a)

PATIL, S.D., RHODES, D.G., BURGESS, D.J. Biophysical characterization of anionic lipoplexes, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, p.1-11, 2005.(b)

PAUKKU, T., LAURAEUS, S., HUHTANIEMI, I., KINNUNEN, P.K.J. Novel cationic liposomes for DNA-transfection with high efficiency and low toxicity. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 87, p. 23-29,1997.

PENG, J., HE, X., WANG, K., TAN, W., LI, H., XING, X., WANG, Y. An antisense oligonucleotide carrier based on amino silica nanoparticles for antisense inhibition of cancer cells. **Nanomedicine 2**: 113-120.

PETERSEN, H., FECHNER, P.M., FISCHER, D., KISSEL, T. Synthesis, characterization and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. **Macromolecules**. 2002 (35) 6867-6874.

PIERRI, E. G.; GREMIÃO, M. P. D. Métodos de preparação de lipossomas. **Infarma**, v.11, p. 60-66, 1999.

PLEYER,U., GROTH, D., HINZ, B., KEIL, O., BERTELMANN, E., RIECK, P., RESZKA, R. Efficiency and toxicity of liposome-mediated gene transfer to corneal endothelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 73, p. 1-7, 2001.

PRASAD, T.K., RANGARAJ, N., RAO, N.M. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. **FEBBS Letters**, v. 579, p.2635-2641, 2005.

RADLES, J.O.; KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R. Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**, v. 275, p. 810-814, 1997.

RAKTO, T.A., CUMMINGS, J.P., BLEBEA, J., MATUSZEWSK, K.A. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. **The American Journal of Medicine**[®], v.115, p. 560-69, 2005.

ROESSLER, B.J., BIELINSKA, A.U., JANCZAK, K., LEE, I., BAKER JR, J.R. Substitued β -cyclodextrins interact with PAMAM dendrimer-DNA complexes and modify transfection efficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 283, 124-129 (2001).

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, The Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001 p

SEEDON, 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.

SHARMA, A., SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

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.

SIMÕES, S., MOREIRA, J.N., FONSECA, C., DÜZGÜNEŞ, 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.

SON, K.K., TKACHT, D., ROSENBLATT, J. Delipidated serum abolishes the inhibitory effect of serum on in vitro liposome-mediated transfection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1511, p.201-205, 2001.

STEIN, C.A., CHENG, Y.-C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents- are the bullet really magical? **Science**, n. 261, p. 1004-1012, 1990.

STERNBERG, B., SORGI, F.L., HUANG, L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. **Science**, v. 275, p. 810-814, 1997.

SUBRAMANIAN, M., HOLOPAINEN, J.M., PAUKKU, T., ERIKSSON, O., HUHTANIEMI, I., KINNUNEN, P. K. J. Characterization of three novel cationic lipids as liposomal complexes with DNA. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1466, p. 289-305, 2000.

TAN, Y., HUANG, L .Overcoming the inflammatory toxicity of cationic gene vectors. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 2, p. 153-160, 2002.

TEMIN, H.M. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. **Human gene therapy**, v. 1, p. 111-23, 1990.

TRIMAILLE, T., CHAIX, C., PICHOT, C., DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.258, p. 135-145, 2003.

WANG, C-Y., HUANG, L. Highly efficient transfection mediated by pH-sensitive immunoliposomes, **Biochemistry**, v. 28, p.9508, 1989.

WOLFERT, M.A., SEYMOUR, L.W. Cloroquine and amphipathic peptide helixes show synergistic transfection *in vitro*. **Gene Therapy**. 1998; 5:409-414.

WU, G., WU, C.H. Delivery systems for gene therapy. **Biotherapy**,v. 3, p. 87-95, 1991.

XU, Y., SZOKA JR., F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. **Biochemistry**, v. 35, p.5616-5623, 1996.

ZHANG, J.S., LIU, F., HUANG, L. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. **Advanced drug delivery reviews**, v.57, p. 689-698, 2005.