

GUILHERME DINIZ TAVARES

DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOLÓGICA DE LIPOSSOMAS
ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS PARA O
TRANSPORTE DE DNA

BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG

2006

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS PARA O TRANSPORTE DE DNA

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Mônica
Cristina de Oliveira

BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG
2006

"O coração do homem propõe o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos."

Provérbios 16:9

Veja,
Não diga que a canção está perdida
Tenha em fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez!

Beba,
Pois a água viva ainda está na fonte!
Você tem dois pés para cruzar a ponte...
Nada acabou!

Tente,
Levante sua mão sedenta e recomece a andar!
Não pense que a cabeça agüenta se você parar,
Há uma voz que canta, uma voz que dança, uma voz que gira
Bailando no ar...

Queira,
Basta ser sincero e desejar profundo!
Você será capaz de sacudir o mundo!
Tente outra vez...

Tente,
E não diga que a vitória está perdida!
Se é de batalhas que se vive a vida...
Tente outra vez!

(Raul Seixas, Paulo Coelho e Marcelo Motta)

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me iluminar durante toda a minha vida, permitindo que mais este sonho se realizasse.

Aos meus queridos pais, Tavares e Bilú, pelo amor e dedicação! Obrigado por serem um alicerce tão sólido em minha vida e por tornarem possível a continuidade dos meus estudos. Tudo que sou devo a vocês!

À Professora Dra Mônica Cristina de Oliveira pela oportunidade, paciência, orientação segura e por reforçar uma das maiores verdades: a de que “O trabalho vem sempre antes do sucesso”.

Às minhas “mães-irmãs”, Lú e Rê, pelo imenso carinho e amizade! Sem a força e o amor de vocês, com certeza eu não chegaria até aqui!

Ao meu sobrinho e afilhado Diogo, uma benção de Deus que apareceu para iluminar nossas vidas...

Aos meus familiares pelo incentivo e orações! Tenho muito orgulho de estar entre vocês!

Aos professores Lucas, Vildete, Valbert e Armando pela agradável convivência e incentivo na elaboração deste trabalho. Em especial, ao Professor Gilson pelos sábios conselhos, inestimável ajuda e amizade sincera!

Ao Professor Pesquero, pela valiosa colaboração e prontidão em ajudar sempre!

À Professora Wânia e ao José Geraldo por terem me acompanhado e me auxiliado com tanto afincamento nos experimentos de biologia molecular.

À Margareth e, em especial, ao Vilela pela ajuda, interesse e empolgação à medida que obtínhamos “nossas imagens”.

À Cristiane Michelletti e ao Fábio pela importante ajuda para que este trabalho se concretizasse.

À família do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica pela boa convivência e incentivo constante! Através das várias gerações que passaram pelo laboratório, aprendi muito! Em especial agradeço à Elaine, ao Álvaro, à Vivi, à Berta, à Sália, à Érika, à Cristiane Giubert e à Ju pela grande ajuda, pelas boas conversas e palavras de conforto nas horas mais difíceis. Lembrarei de vocês para sempre!

Em especial, agradeço àquelas pessoas que se tornaram mais que colegas de trabalho, e sim verdadeiros e eternos amigos: Samuel, Flávia Spotto e Gisele. Vocês terão sempre meu respeito, meu ombro e um lugar em meu coração!

Aos amigos do laboratório de Radioisótopos: Maira, Dani, Paulo e, em especial, à Lú, pela convivência agradável, estímulo e ajuda constante.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade: Zé “Goiaba”, Gisele e Fernando pela amizade e pelos inesquecíveis “almoços diferentes”.

Á Rute por ter sido a melhor professora de Química Farmacêutica do mundo, pela ajuda em todos os momentos e pelos conselhos sempre pertinentes!

Aos amigos especiais que me proporcionam sempre momentos tão intensos: Flávia Dayrell, Thiago Linces, “Tocha”, Hernane, Cris Seixas, Ed, Karine “Tiry”, Maria Laine, Marco “Bala”, Alê e Gustavo “Krawser”.

Á Jana por ser tão parecida comigo! Ao seu lado vivi vários momentos com certeza inesquecíveis! Amo você pra sempre!

Ao Vini, pela lealdade, compreensão e por sempre estar ao meu lado.

Á Cilinha por me acolher tão prontamente em um dos momentos mais difíceis da minha vida! Sempre serei grato por seu respeito e carinho! Obrigado por tudo!

Aos eternos irmãos da República Xequemate pelos bons e inesquecíveis anos de Ouro Preto! Com vocês aprendi muito a respeitar, compartilhar e ajudar o próximo!

Aos amigos que conquistei e hoje são tão importantes para mim: Mari, Ariane, “Muda”, “Dapa”, Lú, “Fêfê” e Thiago. Obrigado por estarem comigo nestes tempos difíceis! O incentivo de vocês foi valioso!

Ao “Padre Euzébio” pela amizade e pelos bons papos nos corredores

Ao Mayerson, pela paciência nos ensinamentos a respeito da cultura de células e por ter se tornado um grande amigo!

A Soninha, pelo incentivo e dedicação às “nossas células”.

À Manuela, por compartilhar comigo todas as aflições e alegrias da cultura de células.

À Professora Fátima, ao Professor Robson e a Leonora pela gentileza em ceder as células CHO.

Aos professores e pesquisadores que permitiram a utilização de seus laboratórios para a realização deste trabalho

À Ana Cristina pela preciosa ajuda e por me tirar de todas as enrascadas!

Aos amigos professores que sempre estiveram dispostos a ajudar: Idelfonso, Cássia, Elias, Marta, Fernanda, Glorinha, Carla, Neusa e Lu “Moranguinho”.

Às professoras Beth, Danielle e Ivana e ao professor Dupim pela compreensão e apoio e pela concessão de licença para que eu pudesse terminar este trabalho.

Aos verdadeiros mestres da Escola de Farmácia da UFOP, principais responsáveis por minha vontade em lecionar!

Aos que me acolheram com carinho na FAFAR – UFMG.

E a todos os alunos que me fazem sentir útil...

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE FIGURAS..... | III |
| LISTA DE TABELAS | IV |
| RESUMO | V |
| INTRODUÇÃO GERAL | 2 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 6 |
| 1. LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE GENES | 6 |
| 1.1 TERAPIA GÊNICA | 6 |
| 1.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO EMPREGADOS NOS ESTUDOS DE TERAPIA GÊNICA | 7 |
| 1.2.1 Polímeros | 9 |
| 1.2.1.1. Polietileniminas | 10 |
| 1.2.1.2. Poli(L-lisina) | 10 |
| 1.2.1.3. Quitosanas | 11 |
| 1.2.1.4. Dendrímeros | 11 |
| 1.2.2 Lipossomas | 12 |
| 1.2.2.1 Lipossomas catiônicos | 12 |
| 1.2.4.2 Lipossomas aniônicos | 15 |
| 1.2.4.3 Lipossomas pH-sensíveis | 18 |
| 2. CICLODEXTRINAS | 24 |
| OBJETIVOS | 29 |

| | |
|--|----|
| 1. Objetivo geral | 29 |
| 2. Objetivos específicos | 29 |
| Trabalho experimental | 31 |
| I – DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS PARA O TRANSPORTE DE DNA | 32 |
| 1. INTRODUÇÃO | 32 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 2.1. MATERIAL | 33 |
| 2.2. PREPARO DE PLACAS DE PÉTRI CONTENDO O MEIO LB-ÁGAR | 34 |
| 2.3. OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL | 34 |
| 2.4. OBTENÇÃO DO COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA | 36 |
| 2.5. ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO B-CD ⁺ /DNA EM LIPOSSOMAS pH- SENSÍVEIS | 36 |
| 2.5.1. Método de evaporação em fase reversa | 36 |
| 2.5.1.1. Obtenção de uma emulsão A/O | 36 |
| 2.5.1.2. Obtenção dos lipossomas..... | 37 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 3.1. Obtenção do DNA plasmidial | 37 |
| 3.2. Avaliação da formação do complexo β -CD ⁺ /DNA..... | 40 |
| II. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β - CD ⁺ /DNA | 43 |
| 1. INTRODUÇÃO | 43 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.1. MATERIAL | 43 |
| 2.2. Determinação da taxa de encapsulação do complexo β -CD ⁺ /DNA em lipossoms aniônicos pH-sensíveis | 44 |
| 2.3. Determinação do tamanho e potencial zeta dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD ⁺ /DNA | 45 |
| 2.3.1. Determinação do tamanho das partículas | 45 |
| 2.3.2. Determinação do potencial zeta | 46 |
| 2.3.3. Análise morfológica por microscopia de força atômica | 48 |
| 3. Resultados e discussão | 53 |
| 3.1. Avaliação da taxa de encapsulação do complexo β -CD ⁺ /DNA em lipossomas aniônicos pH-sensíveis | 53 |
| 3.2. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS | 54 |
| 3.3. Análise morfológica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis e de seus componentes | 56 |
| III. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA | 61 |
| 1. INTRODUÇÃO | 61 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 2.1. MATERIAL | 61 |
| 2.1.1. Meio de cultura, antibióticos e reagentes | 61 |
| 2.1.2. Linhagem celular | 63 |
| 2.2. MÉTODOS | 63 |
| 2.2.1. Preparo do meio de cultura | 63 |
| 2.2.2. Preparo das soluções e dispersões | 63 |
| 2.2.2.1. Preparo do tampão PBS pH 7,4 | 63 |
| 2.2.2.2. Diluição dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis contendo o complexo β -CD ⁺ /DNA | 64 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2.3. Diluição do produto comercial Lipofectin® | 64 |
| 2.2.3. Cultivo das células | 65 |
| 2.2.4. Medida da viabilidade celular com o emprego do azul de Trypan | 66 |
| 2.2.5. Avaliação da citotoxicidade | 67 |
| 2.2.6. Análise estatística | 68 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| DISCUSSÃO GERAL | 74 |
| ASPECTOS FARMACOTÉCNICOS DO DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA | 74 |
| AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DOS LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA | 78 |
| CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| ANEXO | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|--|
| β -CD | β -ciclodextrina |
| β -CD ⁺ | 6-monodeoxi-6-monoamina- β -ciclodextrina |
| β -CPD | 6A,6D-dideoxi-6A,6D-di(2-aminoetanotio)- β - ciclodextrina |
| β -Gal | β -galactosidase |
| A/O | Água/óleo |
| AFM | Microscopia de Força Atômica, do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i> |
| CD | Ciclodextrina |
| CHEMS | Hemisuccinato de coleslerila |
| CHO | Células ovarianas de <i>hamster</i> chinês, do inglês, " <i>Chinese Hamster Ovary</i> " |
| CHOL | Colesterol |
| CS | Surfactantes catiônicos |
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| DC-CHOL | 3 β -(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]-colesterol |
| DCP | Diacetilfosfato |
| DDAB | Brometo de dimetiloctadecilamônio |
| DDAB ₁₂ | Brometo de didodecildimetilamônio |
| DDAB ₁₈ | Brometo de dioctadecildimetilamônio |
| DMPG | Dimiristoilfosfatidilglicerol |
| DMTAP | Dimiristoiltrimetilamônio propano |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOGS | Cloreto de dioctadecildimetilamônio |

| | |
|------------------|--|
| DOPE | Dioleoilfosfatidiletanolamina |
| DOPG | 1,2-dioleoilfosfatidilglicerol |
| DOTAP | 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano |
| DOTMA | Brometo de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamônio |
| DPPC | Dipalmitoilfosfatidilcolina |
| DPPE | Dipalmitoilfosfatidiletanolamina |
| DPPG | Dipalmitoilfosfatidilglicerol |
| | Dipalmitoiltrimetilamônio propano |
| DPTAP | |
| DSTAP | Diestearoiltrimetilamônio propano |
| GM1 | Monosialo-gangliosídeo-GM1 |
| HEPES | N-2-hidroxietilpiperazina |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória do crescimento celular em 50% |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MTT | Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PEI | Polietilenimina |
| PKC | Fosfoquinase C |
| PLL | Poli(L-lisina) |
| PS | Fosfatidilserina |
| REV | Evaporação em fase reversa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| Tris | Tris-(hidroximetil)aminometano |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química da dioleoilfosfatidiletanolamina e do hemisuccinato de colesterila | 20 |
| Figura 2 – Transições de fases de lípides | 21 |
| Figura 3 – Ilustração esquemática da liberação do material encapsulado em lipossomas pH-sensíveis | 22 |
| Figura 4 – Estrutura esquemática das ciclodextrinas | 25 |
| Figura 5- Esquema do plasmídeo pGEM-T | 35 |
| Figura 6 - Placa de petri contendo as colônias de E. coli DH5 α após o procedimento de transformação e crescimento | 38 |
| Figura 7 – Gel de agarose contendo o padrão Lambda DNA/EcoRI-HindIII e o plasmídeo pGEM-T | 40 |
| Figura 8 – Gel de agarose contendo o complexo β -CD ⁺ /pGEM-T em diferentes razões de carga | 41 |
| Figura 9 – Representação esquemática do potencial zeta de dispersões coloidais ou suspensões | 48 |
| Figura 10 - Desenho esquemático do princípio de funcionamento da técnica de AFM | 49 |
| Figura 11 – Esquema do tratamento prévio da mica para a obtenção da imagem do DNA plasmidial | 53 |
| 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 | 57 |
| 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 | 59 |
| Figura 14 - Imagens topográficas de microscopia de força atômica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis sem (A) e com o complexo β CD ⁺ /DNA | 60 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação da taxa de encapsulação do complexo β -CD⁺/pGEM-T em lipossomas aniônicos pH-sensíveis 54

Tabela 2 – Determinação do diâmetro e potencial zeta dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis 55

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 70

RESUMO

A terapia gênica representa uma nova e promissora modalidade na prática médica para o tratamento de doenças resultantes de alterações moleculares do DNA, tais como os diversos tipos de câncer e doenças degenerativas. No entanto, a utilização de ácidos nucleicos neste tipo de terapia é limitada devido a sua baixa penetração no interior celular e instabilidade nos fluidos biológicos. Por isto, a utilização de carreadores é de extrema importância para o sucesso da mesma. O emprego de lipossomas catiônicos tem se mostrado satisfatório para a liberação intracelular de genes, porém estes podem apresentar o inconveniente de serem citotóxicos. Assim, a encapsulação do material genético em lipossomas aniônicos pH-sensíveis pode ser interessante como alternativa à toxicidade relatada. No presente trabalho, efetuou-se a complexação prévia do DNA plasmidial com um derivado catiônico da β -ciclodextrina (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. Estes lipossomas foram avaliados quanto às suas características físico-químicas e à sua citotoxicidade empregando-se células CHO. Com a formação do complexo entre o DNA e a β -ciclodextrina catiônica (β -CD⁺) na razão de cargas igual a +/-, foi possível obter a menor quantidade de DNA livre. A quantidade de DNA encapsulada nos lipossomas aniônicos pH-sensíveis foi de aproximadamente 10-14 μ g/mL.

O diâmetro médio e o potencial zeta destas vesículas lipídicas foi igual a $186,0 \pm 7,5$ nm e $-56,0 \pm 3,7$ mV, respectivamente. Além disso, estas apresentaram uma maior homogeneidade na distribuição do tamanho quando comparadas à formulações sem o complexo β -CD⁺/DNA (índice de polidispersão = $0,20 \pm 0,14$ versus $0,11 \pm 0,02$, para os lipossomas “brancos” e para os lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA, respectivamente). Esta maior homogeneidade também foi observada através da análise morfológica dos lipossomas aniônicos pH-sensíveis por Microscopia de Força Atômica (AFM). Os lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA mostraram vesículas mais homogêneas e estáveis quando da sua deposição sobre a mica. 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. 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[®]. Comparando-se os valores da viabilidade celular para ambas as formulações diluídas de 5 a 5.000.000 de vezes, percebe-se que não há diferença estatisticamente significativa entre estes valores e aqueles apresentados pelos grupos controle. 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.

