

BERTA ROLLA NUNES

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS
COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS
EMPREGADOS COMO CARREADORES DE
ÁCIDOS NUCLÉICOS**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA /UFMG**

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BERTA ROLLA NUNES

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES
DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS EMPREGADOS COMO
CARREADORES DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Magalhães Paniago

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2007

A Deus e ao meu querido pai...
Que mesmo estando longe, estão muito perto...

AGRADECIMENTOS

A Profa. Orientadora Mônica, pela oportunidade, incentivo e amizade durante toda a realização deste trabalho.

Ao meu marido Welser, pelo amor e confiança.

A minha família, pela motivação e apoio.

Ao Prof. Rogério pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

A Profa. Wânia pela grande ajuda e disponibilidade de sempre.

Aos amigos e colegas do laboratório pela força e apoio durante esta jornada.

Enfim a todos que colaboraram pela realização deste trabalho.

"A ciência é a tentativa de compreender a realidade.
É uma atividade quase religiosa, na mais ampla acepção da palavra."

George Wald

NUNES, Berta Rolla. Estudo das interações entre os componentes dos lipossomas pH-sensíveis empregados como carreadores de ácidos nucleicos. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

A terapia baseada em DNA tem emergido recentemente como uma estratégia promissora para uma gama ampla de doenças, incluindo desordens herdadas e adquiridas, por exemplo câncer, AIDS, fibrose cística, hemofilia, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. O sucesso da terapia gênica depende da introdução de genes exógenos dentro das células, permitindo a substituição do gene defeituoso, e, conseqüentemente, a restauração da função normal da célula. Devido à pobre captação celular e à instabilidade biológica do DNA, a transfecção de DNA tem sido realizada usando vetores virais e não-virais. Porém, a toxicidade, potencial para gerar uma resposta imune e mutagênese e dificuldades em controle tem limitado a aplicação de vetores virais. Então, carreadores não-virais são uma alternativa a vetores virais. As vantagens destes sistemas de liberação são a ausência de resposta imune e uma facilidade em formulação e montagem. Nós desenvolvemos um novo sistema lipídico aniônico contendo DNA. Este sistema é obtido pela complexação prévia de moléculas de DNA a ciclodextrinas catiônicas (CD), seguido da sua encapsulação em lipossomas pH-sensíveis. Estes lipossomas são compostos por dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e hemisuccinato de colesterila (CHEMS). Os lipossomas pH-sensíveis são capturados pelas células por endocitose. Eles aproveitam-se da diminuição do pH que acontece dentro dos endossomas (pH 6.5 a 5.5), o que permite a protonação do CHEMS e em seguida ocorre rompimento da estrutura da bicamada, conduzindo a liberação do DNA. Assim, para esclarecer as conseqüências estruturais das interações do complexo CD/DNA com as bicamadas dos lipossomas, e especialmente com o DOPE, estudos de DSC e difração de raios-X foram feitos em condições de baixa e alta hidratação. Estes estudos revelaram a existência de interações entre DOPE e o complexo CD/DNA conduzindo a modificações supramoleculares. O conhecimento destes eventos é importante para compreender a eficácia destes carreadores em estudos biológicos.

Palavras-chave: Lipossomas; Dioleoilfosfatidiletanolamina; Calorimetria exploratória diferencial; Difração de raios-X.

ABSTRACT

DNA-based therapy has emerged in recent years as a promising strategy for a wide range of diseases, including inherited and acquired disorders, such as cancer, AIDS, cystic fibrosis, hemophilia, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. The success of gene therapy depends on the introduction of exogenous genes into cells, allowing the replacement of the defective gene, and, consequently, the restoration of the normal cell function. Due to the poor cellular uptake and biological instability of DNA, DNA transfection has been performed using both non-viral and viral vectors. However, the toxicity, potential for generating an immune response and mutagenesis and difficulties in upscaling and control have limited the application of viral vectors. Thus, non-viral carriers are an alternative to viral vectors. The advantages of these delivery systems are a lack of immune response and an ease in formulation and assembly. We developed a new anionic lipidic system containing DNA. This system is obtained by the previous binding of DNA molecules to cationic cyclodextrins (CD), followed by their encapsulation into pH-sensitive liposomes. These liposomes are composed by dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and cholesteryl hemisuccinate (CHEMS). The pH-sensitive liposomes are taken up by the cells by endocytosis. They take advantage of the decrease in pH which occurs inside endosomes (pH 6.5 to 5.5), allowing the protonation of CHEMS followed by liposomes collapse into a nonbilayer structure, thereby leading to its disruption and the release of DNA. Thus, in order to clarify the structural consequence of the interactions of the CD/DNA complex with the liposomes bilayers, and especially on DOPE, the DSC and X-ray diffraction studies were carried out at low hydration and high hydration. These studies revealed the existence of interactions between DOPE and CD/DNA complex leading to the supramolecular modifications. The knowledge of these events is important to the understanding of the efficacy of these carriers in biological studies.

Key-words: Liposomes; Dioleoylphosphatidylethanolamine; Differential scanning calorimetry; X-ray diffraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos lipossomas.....	15
Figura 2: Estrutura química da dioleilfosfatidiletanolamina (A) e do hemisuccinato de colesterila (B).....	17
Figura 3: Transições de fases de lípides.....	18
Figura 4: Topologia das fases hexagonais direta (H_I) e inversa (H_{II}).....	20
Figura 5: Empilhamento lateral das cabeças polares na formação de ligações de hidrogênio das moléculas da fosfatitiletanolamina DLPE	21
Figura 6: As estruturas intermediárias micelares inversas e as interações entre as membranas (IMI).....	22
Figura 7: Estrutura das ciclodextrinas.....	25
Figura 8: Representação esquemática do empacotamento molecular das fases lamelar e hexagonal.....	34
Figura 9: Curvas de DSC dos constituintes dos lipossomas pH-sensíveis: (A) DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /TRIS , (B) DOPE/TRIS, (C) DOPE/CHEMS/DNA/TRIS, (D) DOPE/CHEMS/TRIS e (E) DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD ⁺ /TRIS.....	35
Figura 10: Padrões de difração de raios-X da DOPE/Tris.....	36
Figura 11: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/Tris.....	38
Figura 12: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/Tris.....	40
Figura 13: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /TRIS.....	41
Figura 14: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD ⁺ /TRIS.....	42
Figura 15: Estrutura esquemática do plasmídeo pGEM-T.....	47
Figura 16: Gel de agarose contendo o padrão Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> - <i>HIND III</i> (A) e o plasmídeo pGEM-T (B).....	53
Figura 17: Curva de DSC de DOPE/Tris.....	55
Figura 17 A: Ampliação da curva de DSC de DOPE/Tris	55
Figura 17B: Ampliação da curva de DSC de DOPE/Tris.....	56
Figura 18: Padrões de difração de raios-X de DOPE/Tris.....	56
Figura 19: Curva de DSC de DOPE/CHEMS/Tris.....	58
Figura 20: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/Tris.....	58
Figura 21: Curva de DSC da amostra DOPE/CHEMS/DNA/Tris.....	60
Figura 22: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/Tris.....	61
Figura 23: Curva DSC da amostra DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /Tris.....	62
Figura 23 A: Ampliação da curva de DSC da amostra DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /Tris.....	63
Figura 24: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /Tris.....	63
Figura 25: Curva DSC da amostra DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD ⁺ /Tris.	65
Figura 26: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /DNA/Tris....	65
Figura 27: Variação do diâmetro de lipossomas pH-sensíveis em função do pH...68	
Figura 28 :Variação do potencial zeta de lipossomas pH-sensíveis em função do pH.....	69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Lipossomas.....	15
1.2 Organização supramolecular dos fosfolípides.....	19
1.3 Ciclodextrinas.....	23
OBJETIVOS	28
TRABALHO EXPERIMENTAL	29
CAPÍTULO I ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β-CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA SOB CONDIÇÕES DE BAIXA HIDRATAÇÃO	30
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 MATERIAL.....	31
2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BAIXO TEOR DE HIDRATAÇÃO.....	32
2.3 CALORIMÉTRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	33
2.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1 MISTURA DOPE/TRIS.....	35
3.2 MISTURA DOPE/CHEMS/TRIS.....	36
3.3 MISTURA DOPE/CHEMS/DNA/TRIS.....	38
3.4 MISTURA DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /TRIS.....	40
3.5 MISTURA DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /DNA/TRIS.....	41
CAPÍTULO II ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β-CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA NUM MEIO HIDRATADO	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 MATERIAL.....	44
2.2 PREPARO DE PLACAS DE PÉTRI CONTENDO O MEIO LB-ÁGAR.....	45
2.3 OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	45
2.4 ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO B-CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA EM LIPOSSOMAS PH-SENSÍVEIS.....	47

2.4.1 Método de evaporação em fase reversa.....	47
2.4.1.1 Obtenção do complexo β -CD ⁺ /DNA.....	47
2.4.1.2 Obtenção de uma emulsão A/O	48
2.4.1.3 Obtenção dos lipossomas.....	48
2.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HIDRATADAS.....	49
2.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	49
2.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	50
2.8 DETERMINAÇÃO DA pH-SENSIBILIDADE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1 OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	51
3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DE VARREDURA (DSC) E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	54
3.2.1 Mistura DOPE/Tris.....	54
3.2.2 Mistura DOPE/CHEMS/TRIS.....	57
3.2.3 Mistura DOPE/CHEMS/DNA/TRIS.....	59
3.2.4 Mistura DOPE/CHEMS/ β -CD ⁺ /TRIS.....	61
3.2.5 Mistura DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD ⁺ /TRIS.....	64
3.3 DETERMINAÇÃO DA pH-SENSIBILIDADE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO β -CD ⁺ /DNA.....	66
CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

INTRODUÇÃO

1 Introdução

Os avanços das pesquisas em biologia molecular resultaram na descoberta de seqüências gênicas de bactérias, vírus, protozoários como também de alterações genômicas humanas responsáveis pelo aparecimento de uma variedade de doenças, contribuindo assim com o desenvolvimento das terapias antisense e gênica [1-2]. 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 de microorganismos ou de genes humanos modificados, poderá impedir o aparecimento de estados patológicos. A terapia gênica implica na inclusão celular de genes inexistentes ou ainda na correção de genes modificados através da inserção da seqüência gênica inalterada [3]. As terapias antisense e gênica 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 [4].

No entanto, a eficácia da terapia antisense e gênica é limitada pela reduzida penetração celular de moléculas de RNA e/ou DNA e seus fragmentos, os quais são moléculas polianiônicas, como também pela instabilidade destas moléculas nos líquidos celulares [3]. Assim sendo, para a eficiência dessas 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, o qual representa um dos passos-chave para estes agentes terapêuticos [5]. Estes sistemas devem apresentar baixa toxicidade, ótima estabilidade, possuir um custo acessível para sua produção em quantidades relevantes, além de apresentarem uma capacidade de liberação eficiente e tecido-específica quando administrados *in vivo* [6]. Várias estratégias têm sido avaliadas para o estabelecimento de um adequado sistema de liberação de genes no interior das células, sendo que as mais empregadas possuem como constituintes os vetores virais (adenovírus e retrovírus), 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. No entanto, apesar de sua eficiência, estes vetores apresentam como inconvenientes o aparecimento de uma resposta imunológica contra a proteína codificada pelo transgene [5-7], além da dificuldade de sua produção em larga escala [8]. 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 [9-10]. Dessa forma, a utilização de carreadores sintéticos, ou vetores não-virais, vem sendo amplamente investigada na tentativa de contornar as limitações supracitadas.

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 últimos são protegidos contra a degradação por DNAses e compactados para penetrar no interior celular via

endocitose [11]. Vários diferentes sistemas estão atualmente sob investigação, incluindo emulsões lipídicas catiônicas, dendrímeros, polietileniminas (PEIs), polímeros e lipossomas catiônicos [12-13].

Há um número considerável de publicações com evidências de que os lipossomas catiônicos promovem a liberação de genes através da demonstração da expressão de um gene “reporter” em culturas de células bem como *in vivo*, via injeção local [14]. Entretanto, a transfecção de genes mediada por lipossomas catiônicos mostra-se usualmente baixa na presença de soro, além de apresentar, geralmente, citotoxicidade *in vitro* [15]. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de um vetor sintético capaz de encapsular eficazmente moléculas de DNA, permitir a penetração celular e liberação do material genético no citoplasma e não apresentar citotoxicidade.

Dessa forma, nessa dissertação de mestrado, foi preparado um sistema lipídico o qual consistiu da complexação prévia de moléculas de DNA com ciclodextrina catiônica, seguida da encapsulação do complexo DNA/ciclodextrina catiônica em lipossomas pH-sensíveis. Esse sistema foi caracterizado sob parâmetros físico-químicos relativos à investigação da existência de interações entre a bicamada lipídica e o complexo DNA/ciclodextrina catiônica mediante o emprego de calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X. A investigação da ocorrência dessas interações se justifica devido a importância da transição de fase lamelar/hexagonal do fosfolípide dioleilfosfatidiletanolamina, utilizado na composição dos lipossomas pH-sensíveis, para a eficácia de liberação do complexo DNA/ciclodextrina catiônica no citoplasma.

1.1 Lipossomas

Os lipossomas são sistemas vesiculares, geralmente constituídos por fosfolípides, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas contendo em seu interior uma cavidade aquosa (Figura 1). Devido à sua propriedade anfifílica, os lipossomas são capazes de incorporar substâncias de caráter hidrofílico no compartimento aquoso, substâncias lipofílicas no interior das bicamadas lipídicas, ou ainda, substâncias anfifílicas entre estes dois compartimentos. Estes sistemas lipídicos foram descritos pela primeira vez, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas [16]. Sendo que o propósito da utilização destas vesículas lipídicas é aumentar o aporte de fármacos às células ou tecidos específicos, conseqüentemente, aumentando a potência e/ou reduzindo a toxicidade do agente encapsulado [17].

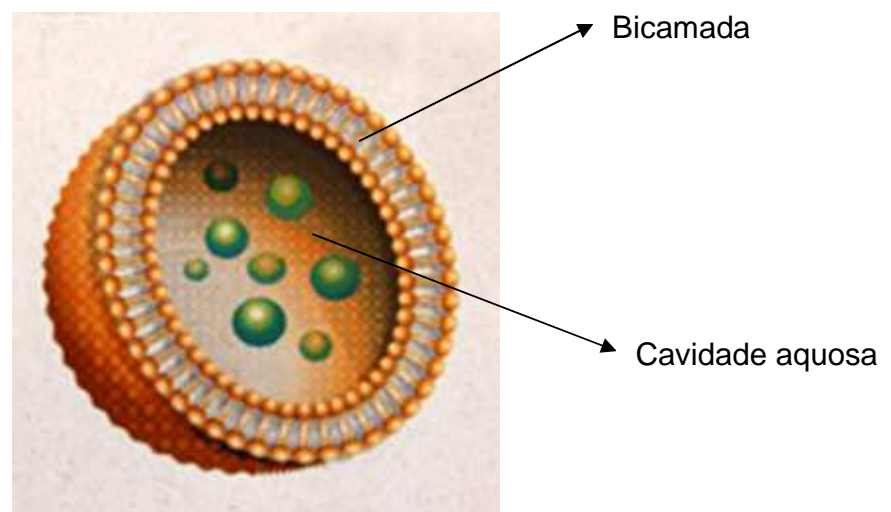


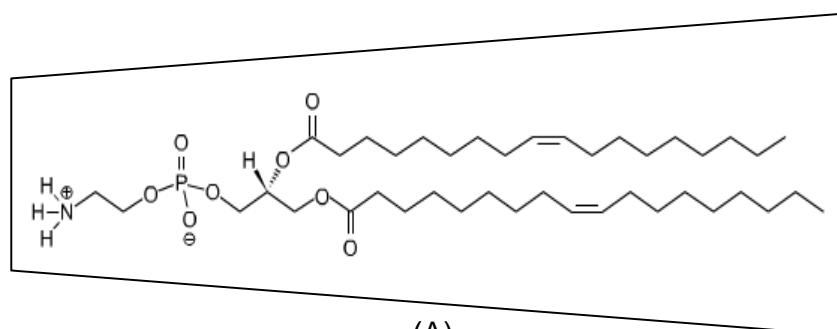
Figura 1 – Estrutura dos lipossomas

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em lipossomas unilamelares pequenos (SUV) - 20 a 100nm - e lipossomas unilamelares grandes (LUV) - > 100 nm - quando constituídos de uma única camada lipídica. Quando as vesículas são formadas por bicamadas sucessivas separadas por compartimentos aquosos os lipossomas são denominados multilamelares (MLV) - 0,1 a 1 μ m [18].

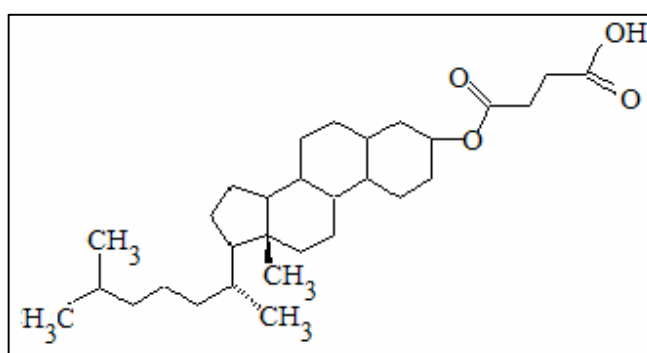
Os lipossomas pH-sensíveis são vesículas constituídas por fosfolípidos particulares que permitem a liberação do material encapsulado em decorrência do decréscimo do pH do meio [19]. O uso de tais lipossomas como sistema de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos patológicos (tumores, metástases, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais [20]. 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 fosfolípidos particulares derivados da fosfatidiletanolamina, como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 2A), que se organizam preferencialmente sob a forma hexagonal (Figura 3) não sendo capazes de formar lipossomas. A formação de lipossomas com tais fosfolípidos requer a adição de agentes estabilizantes que são lípidos carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS) (Figura 2B), que se encontram sob a forma ionizada no pH fisiológico. Tais compostos se inserem entre as moléculas de fosfolípidos e o

aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila e os grupos fosfatos presentes nos fosfolípidos favorecem a organização deles sob a forma lamelar (Figura 3), gerando a formação de lipossomas [21-22]. Estes lipossomas são captados pelas células por endocitose e 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. A fusão e/ou a desestabilização da membrana endossomal pelos lipossomas, no pH ácido, impedirá a fusão dos endossomas com os lisossomas, e conseqüentemente, evitará a degradação das moléculas de DNA pelas enzimas presentes neste último [9].



(A)



(B)

Figura 2 - Estrutura química da dioleilfosfatidiletanolamina (A) e do hemisuccinato de colesterila (B).

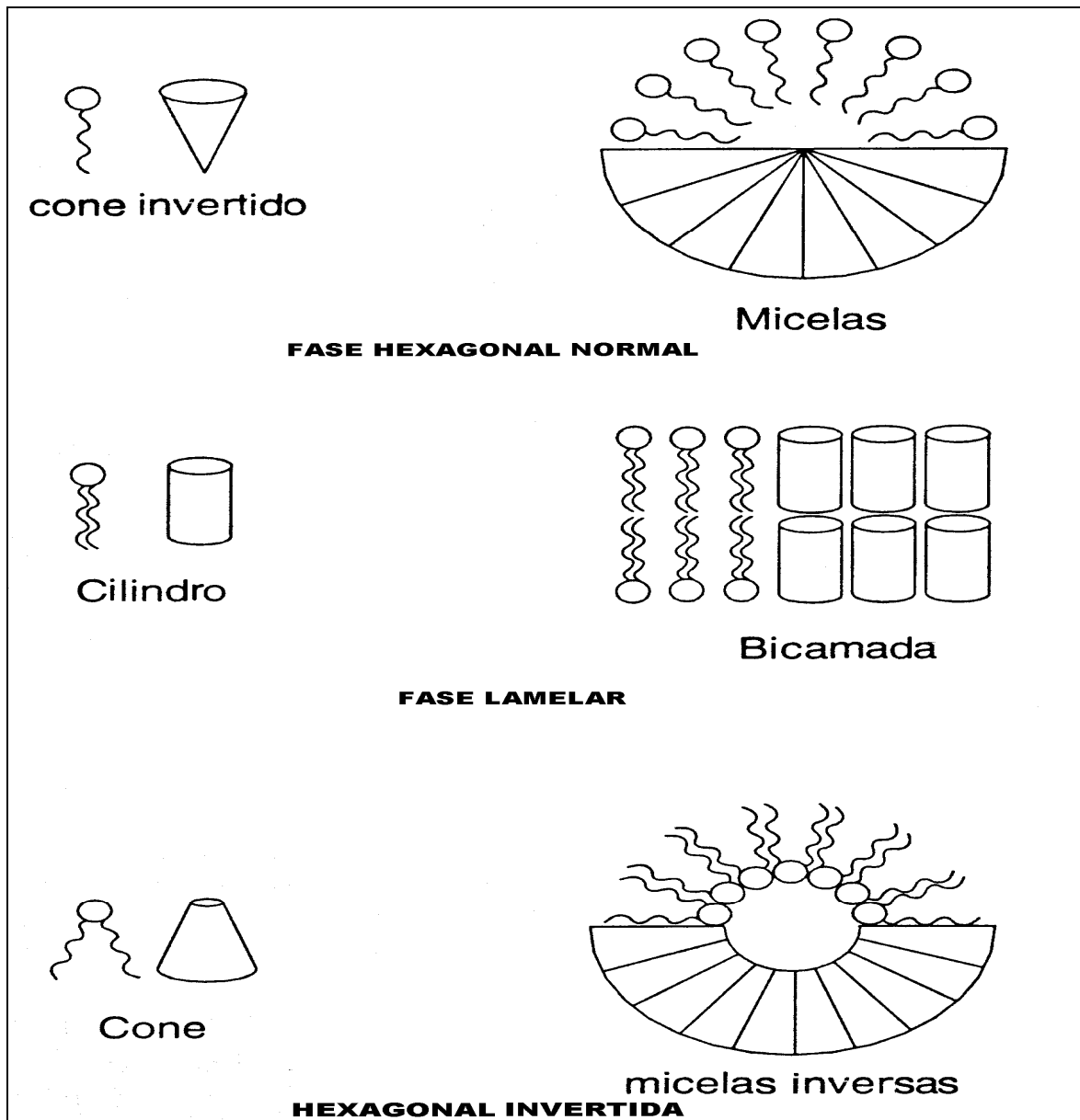


Figura 3 – Transições de fases de lípides. Fonte: Lasic, 1998.

Sobre a utilização destes veículos para a liberação de ácidos nucleicos no interior das células, Simões e colaboradores (2001) relataram que a habilidade em liberar moléculas com peso molecular relativamente alto (por exemplo, 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 [23].

1.2 Organização supramolecular dos fosfolípides

A dispersão dos fosfolípides em meio aquoso pode resultar na formação de estruturas lamelares e/ou não lamelares. As fases não lamelares ou hexagonal podem ser de dois tipos, a saber (Figura 4):

1. Tipo I ou direta, na qual os lípides se encontram dispersos num meio aquoso contínuo (óleo em água).
2. Tipo II ou inverso, na qual as porções polares hidratadas se encontram organizadas numa matriz apolar contínua constituída pela porção hidrofóbica das cadeias alifáticas (água em óleo).

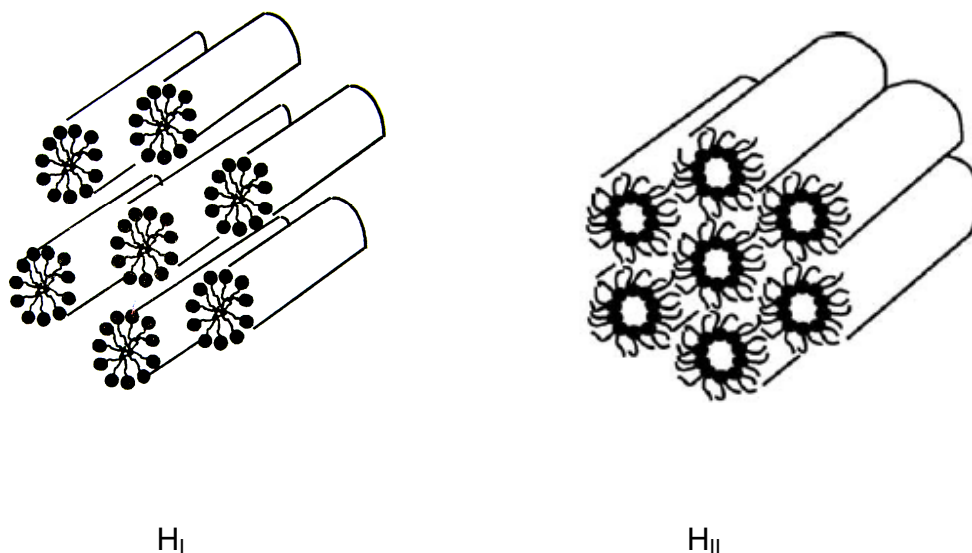


Figura 4: Topologia das fases hexagonais direta (H_I) e inversa (H_{II}).

As estruturas do tipo I são caracterizadas por um raio de curvatura positivo, enquanto as do tipo II apresentam um raio de curvatura negativo. Nas fases lamelares, as moléculas de fosfolípides se encontram organizadas em bicamadas que apresentam uma curvatura igual a zero. A dispersão dos derivados da fosfatidiletanolamina em meio aquoso conduz a uma agregação preferencial em fase hexagonal do tipo II (H_{II}). Isto se explica em função da sua geometria molecular que mostra uma menor área superficial da porção polar em relação à porção apolar, resultando numa forma do tipo cone (Figura 3) [24]. Essa geometria molecular, porção polar de uma molécula de fosfatidiletanolamina e o grupamento fosfato de outra molécula de fosfatidiletanolamina adjacente, conduz a uma redução da hidratação das porções polares (Figura 5) .

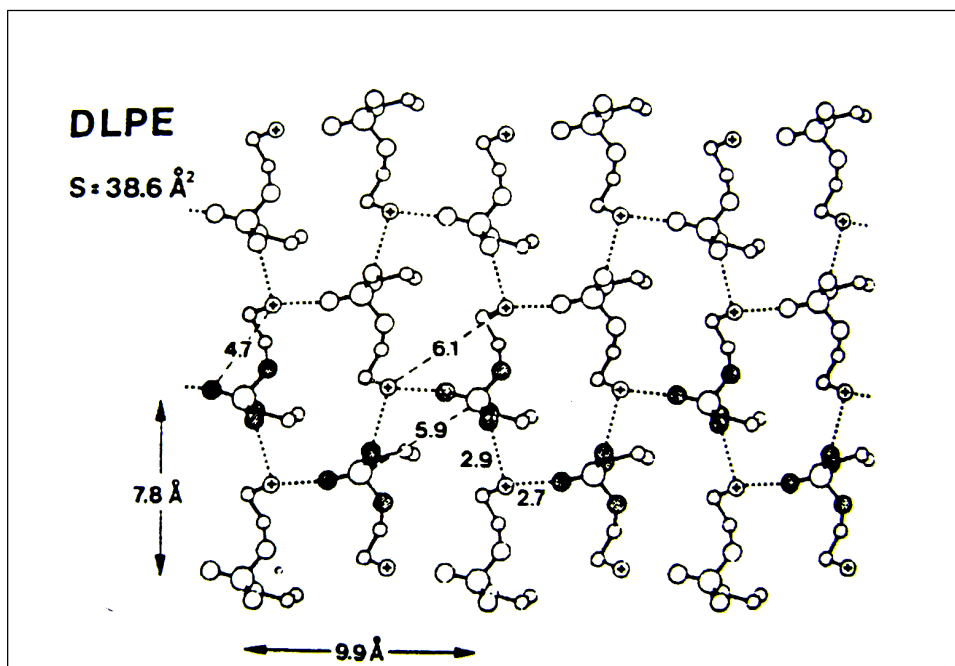


Figura 5: Empilhamento lateral das cabeças polares na formação de ligações de hidrogênio das moléculas da fosfatiletanolamina DLPE . Fonte: Seddon, 1990.

A formação de uma organização supramolecular hexagonal está envolvida nos processos de desestabilização de membranas [25]. No processo de desestabilização de membranas ocorre a aproximação de duas bicamadas lipídicas, seguida da formação de estruturas intermediárias micelares inversas (IMI), que se localizam entre as bicamadas das membranas [26]. As IMI são capazes de induzirem à fusão ou desestabilização de membranas (Figura 6). As IMI podem se agregar originando estruturas hexagonais, o que gera um aumento da tensão interfacial na região da parede das vesículas, seguido da ruptura e liberação do conteúdo presente na cavidade aquosa (Figura 6B). Além disso, as IMI podem provocar a fusão de membranas, após a formação de ligações

interlamelares (ILA), o que resulta na mistura dos lípides e do conteúdo aquoso (Figura 6C).

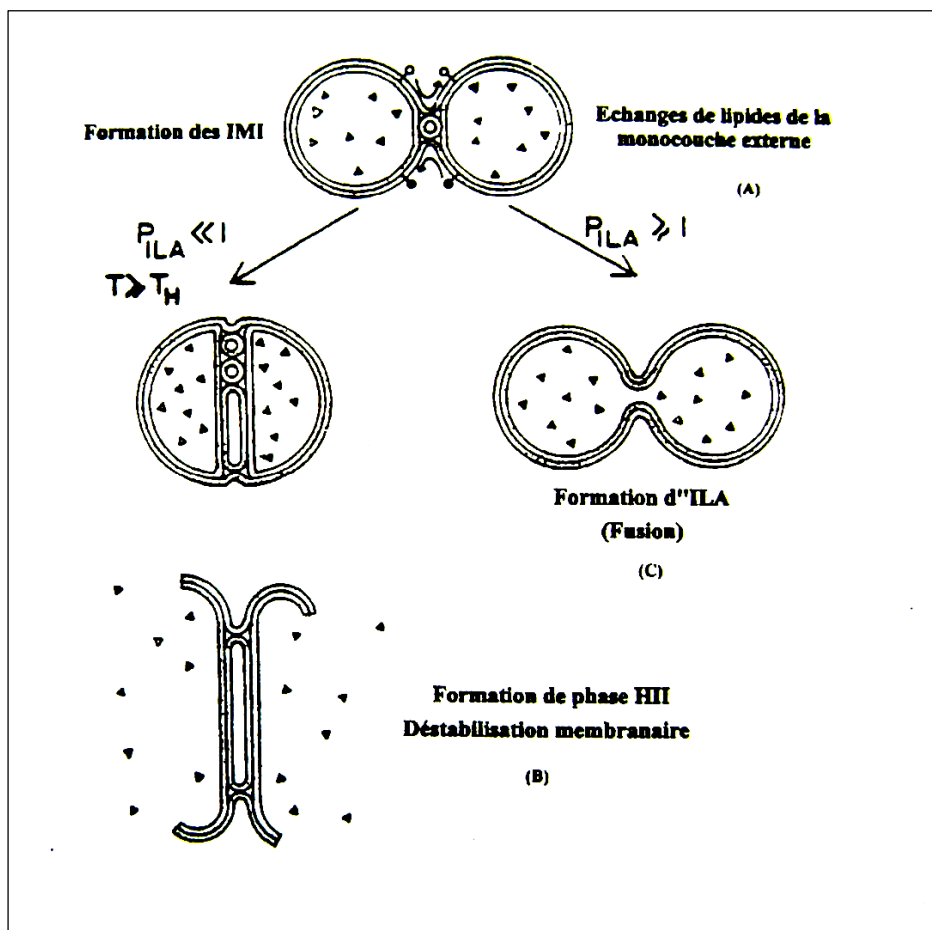


Figura 6: As estruturas intermediárias micelares inversas e as interações entre as membranas (IMI).

No entanto, a formação de ILA é rara, pois somente ocorre quando há flutuações na concentração de lípides das IMI. A frequência dessas flutuações depende da relação da área superficial ocupada pela porção polar da molécula lipídica na fase lamelar (a) e na fase hexagonal inversa (a_0). A formação de ILA é favorecida para os sistemas lipídicos tendo uma relação a/a_0 inferior a 1,2. Os

derivados de fosfatidiletanolamina esterificados com ácidos graxos insaturados e apresentando uma pequena área superficial de sua porção polar têm uma relação a/a_0 igual a 1,8 [27, 28]. Dessa forma, a fusão de membranas mediante a formação de ILA não é comum para os derivados da fosfatidiletanolamina. Portanto, a formação de IMI é uma etapa indispensável para os fenômenos de fusão e desestabilização de membranas. A compreensão desses processos nos permitem estabelecer uma abordagem biomimética, como o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis constituídos por derivados de fosfatidiletanolamina.

1.3 Ciclodextrinas

A ciclodextrina catiônica é um oligossacarídeo cíclico, podendo conter 6, 7 ou 8 unidades de D-glicopiranosídeos, denominadas de α , β e γ ciclodextrina, respectivamente; unidas por ligações α -1,4, contendo também substituintes do tipo amônio quaternário [29]. A forma molecular da ciclodextrina catiônica é do tipo tronco-cônica (Figura 7) apresentando uma cavidade hidrofóbica e a sua superfície externa é hidrofílica [30]. Estudos descritos na literatura mostram que alguns derivados de ciclodextrina catiônica possuem grande habilidade para se ligar às moléculas de ácidos nucleicos [31]. A afinidade das moléculas de ciclodextrina pelas de ácidos nucleicos é claramente influenciada pelo tipo de substituinte presente nos derivados de ciclodextrina. Cryan et al. sintetizaram os derivados heptakis(6-desoxi-6-piridil-4-amino), heptakis(2,3-di-O-acetil-6-desoxi-6-piridil-4-amino), heptakis[2,3-di-O-acetil-6-desoxi-6-(1-metil-1H-imidazol-2-il)],

heptakis[6-(1-n-butil-1H-imidazol-2-il)-6-desoxi], heptakis[2,3-di-O-acetil-6-(1-n-butil-1H-imidazol-2-il)-6-desoxi], heptakis(6-desoxi-6-metoxietilamino) e heptakis(6-amino-6-desoxi) de β -ciclodextrina. As diferentes afinidades desses derivados de ciclodextrina catiônica pelas moléculas de DNA são, provavelmente, devido aos efeitos estéricos e de polaridade. Por exemplo, a inabilidade do derivado heptakis-6-desoxi-6-metoxietilamino- β -ciclodextrina para se ligar às moléculas de DNA está relacionada ao efeito estérico do grupo *N*-metoxietil. O derivado que apresentou melhor ligação às moléculas de DNA foi o heptakis-6-desoxi-6-piridilamino- β -ciclodextrina que, por sua vez, também apresentou um nível de transfecção comparável ao lípido catiônico comumente utilizado em ensaios de transfecção, dioleiltrimetilamôniopropano (DOTAP) [31].

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 acarretará na diminuição do tamanho da molécula de DNA, permitindo um maior teor de encapsulação da mesma nos lipossomas pH-sensíveis.

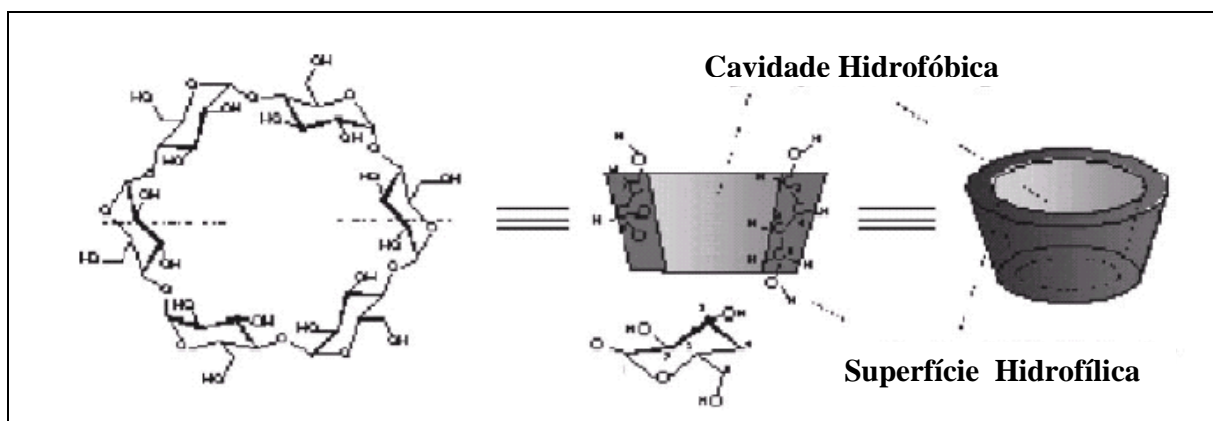


Figura 7– Estrutura das ciclodextrinas. Fonte: Del Valle, 2004 [30].

Assim sendo, a encapsulação do complexo ciclodextrina catiônica/DNA em lipossomas pH-sensíveis poderá ser uma estratégia para a sua captura celular com a eliminação ou redução da toxicidade celular observada para os atuais agentes de transfecção utilizados. Além disso, o uso de lipossomas aniônicos poderá contribuir para uma menor variabilidade da eficiência de transfecção. Diante do exposto, a identificação da organização supramolecular do fosfolípide estrutural dos lipossomas pH-sensíveis (DOPE) é de extrema importância para que se possa garantir a estabilidade desse sistema e sua eficiência de transfecção. O comportamento de fase da dioleoilfosfatidiletanolamina revela a presença de fases essenciais para a formação e desestabilização dos lipossomas, as quais são a fase lamelar alfa (L_{α}) e fase hexagonal II (H_{II}), respectivamente. Portanto, nessa dissertação de mestrado foi realizada a caracterização físico-química desse sistema com o emprego das técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), para examinar as transições térmicas da

dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), e difração de raios-X para a identificação das fases envolvidas nessas transições.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo a realização da caracterização físico-química dos lipossomas pH-sensíveis utilizados como carreadores do complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA. Essa caracterização é importante devido ao fato de que a eficiência de transfecção desses vetores sintéticos está relacionada à sua organização supramolecular.

2. Objetivos específicos

- 1- Estudo das transições de fase dos lípides constituintes dos lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo de β -ciclodextrina catiônica/DNA por calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X;
- 2- Estudo da pH-sensibilidade dos lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA por acompanhamento da variação do diâmetro e potencial zeta em função do pH;

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA SOB CONDIÇÕES DE BAIXA HIDRATAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A identificação da organização supramolecular do fosfolípide estrutural dos lipossomas pH-sensíveis (DOPE) é de extrema importância para que se possa garantir uma estabilidade desse sistema e uma eficiência de transfecção. O comportamento de fase da DOPE revela a presença de fases essenciais para a formação e desestabilização dos lipossomas, as quais são a fase lamelar alfa (L_{α}) e fase hexagonal II (H_{II}), respectivamente. Na primeira parte dessa dissertação de mestrado, o estudo foi realizado em baixas condições de hidratação por nos permitir verificar com maior clareza as possíveis interações entre os componentes desses lipossomas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) foi gentilmente cedida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemisuccinato de colesterila (CHEMS) e o tampão tris-(hidroximetil)aminometano (Tris) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA). 6-monodesoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina (β -CD⁺) foi adquirida da Cyclolab R&D Laboratory (Budapest, Hungria) e o plasmídeo pGEM-T foi fornecido pela Promega (Madinson, EUA).

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BAIXO TEOR DE HIDRATAÇÃO

DOPE e CHEMS foram dissolvidos em clorofórmio para obtenção de soluções nas concentrações de 0,6M e 0,4M, respectivamente. Uma solução metanólica de β -CD⁺ de concentração 5mg/mL também foi utilizada para preparação das amostras. O DNA (solução aquosa a 12,0 μ g/ μ L) utilizado nas amostras foi obtido mediante amplificação e purificação do plasmídeo pGEM-T. Foram preparadas amostras em triplicata contendo os seguintes componentes dos lipossomas pH-sensíveis: DOPE (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,6M) e tampão Tris liofilizado (6,1mg); DOPE (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,6M), CHEMS (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,4M) e tampão Tris liofilizado (6,1mg); β -CD⁺ (92 μ l de uma solução metanólica 5mg/mL), DOPE (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,6M), CHEMS (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,4M) e tampão Tris (6,1mg); DOPE (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,6M), CHEMS (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,4M), DNA (1 μ l de uma solução aquosa a 12,0 μ g/ μ L) e tampão Tris (6,1mg); β -CD⁺ (92 μ l de uma solução metanólica 5mg/mL), DOPE (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,6M), CHEMS (20 μ l de uma solução clorofórmica 0,4M), DNA (1 μ l de uma solução aquosa a 12,0 μ g/ μ L) e tampão Tris (6,1mg). As amostras foram transferidas para os cadinhos de alumínio previamente pesados e os solventes orgânicos foram evaporados, sob ligeiro aquecimento, até a formação de um filme. O tampão Tris liofilizado e a solução de DNA foram adicionados sobre os respectivos filmes de cada amostra conforme a descrição anterior. As amostras que não continham a solução de DNA foram

hidratadas até atingirem peso constante, em uma cuba de hidratação com umidade relativa igual a 39%, conseguida mediante o uso de uma solução saturada de $MgCl_2$. A fração de água absorvida por estas amostras variou de 0,6% a até 3%, ficando compatíveis com as amostras que continham a solução de DNA. Após estabilização, os diferentes cadinhos foram pesados, selados e analisados por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para a análise de difração de raios-X, os mesmos cadinhos contendo as amostras analisadas por DSC foram abertos, os conteúdos foram retirados e depositados num suporte de silício.

2.3. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

As análises calorimétricas foram realizadas no instrumento DSC 2910 Modulated TA Instruments (New Castle, EUA), no intervalo de temperatura de -50°C a 50°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C/min .. O índio foi utilizado para calibração da temperatura e da entalpia. As amostras foram submetidas a 3 corridas consecutivas a fim de permitir uma maior homogeneização do conteúdo colocado nos cadinhos. Os dados obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição foram definidas pela posição dos picos observados nas curvas de DSC.

2.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Como mencionado anteriormente, as amostras para análise de difração de raios-X foram retiradas dos cadinhos, depositadas sobre uma placa de silício e prensadas com o auxílio de uma espátula. As análises foram realizadas na estação experimental D10A-XRD2 (difração de raios-X de alta resolução) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron ($\lambda = 1,54982 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas num intervalo de temperatura de -30°C a 35°C , utilizando para isso um sistema Peltier e um banho com água e etilenoglicol para o resfriamento do porta-amostra. Os padrões de difração de raios-X foram obtidos após equilíbrio térmico e exposição da amostra ao tempo de 350s. As estruturas dimensionais de cada fase foram calculadas e interpretadas como distância lamelar (d_{lam}) ou distância hexagonal (d_{hex}) a partir da linha de difração de primeira ordem. A Figura 8 mostra os parâmetros estruturais relativos ao empacotamento molecular das fases lamelar e hexagonal.

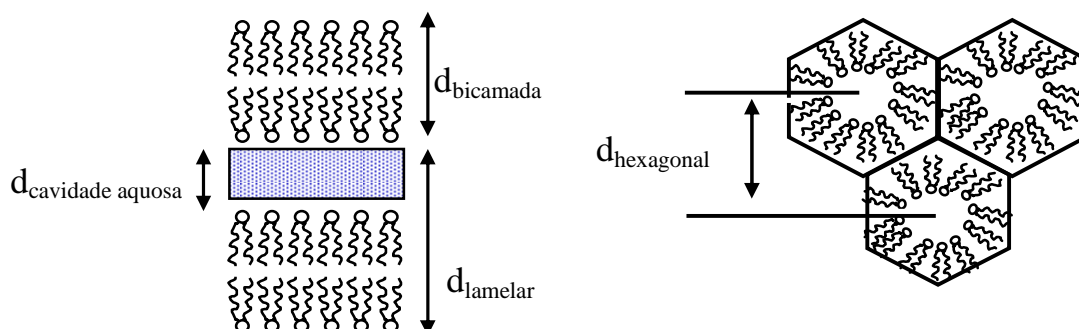


Figura 8 – Representação esquemática do empacotamento molecular das fases lamelar e hexagonal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MISTURA DOPE/TRIS

A curva de DSC da DOPE (Figura 9B) apresentou 3 temperaturas de transição de fase em -26, 10 e 17°C. O difratograma da DOPE (Fig. 10) mostrou razões de reflexão de Bragg iguais a 1,4 e 1,2,4, a -28 e -15°C, o que indica a ocorrência da transição de fase lamelar gel (L_{β}) para lamelar fluido (L_{α}). A 15°C e 35°C, os padrões de difração de raios-X revelaram razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2, indicando a ocorrência da transição de fase L_{α} para fases não lamelares da DOPE. Essas transições de fases não lamelares podem ser atribuídas às transições L_{α}/Q_{II} e Q_{II}/H_{II} .

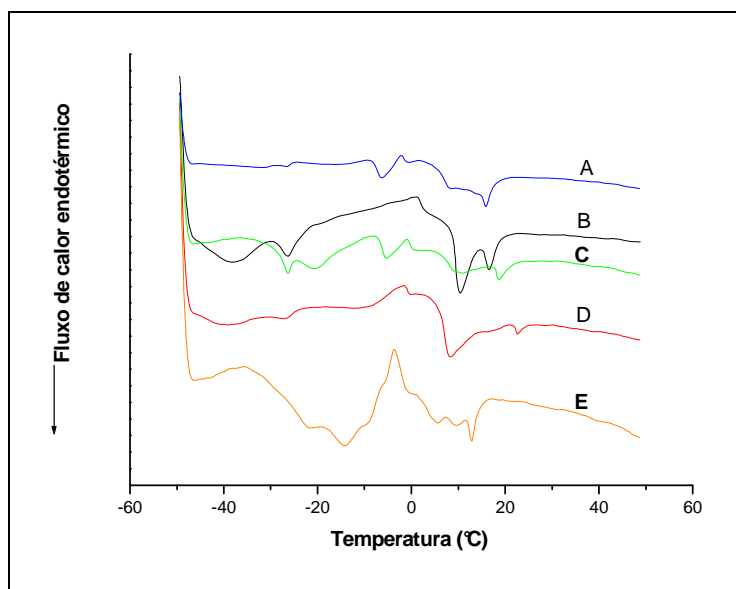


Figura 9: Curvas de DSC dos constituintes dos lipossomas pH-sensíveis: (A) DOPE/CHEMS/ β -CD⁺/TRIS, (B) DOPE/TRIS, (C) DOPE/CHEMS/DNA/TRIS, (D) DOPE/CHEMS/TRIS e (E) DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD⁺/TRIS

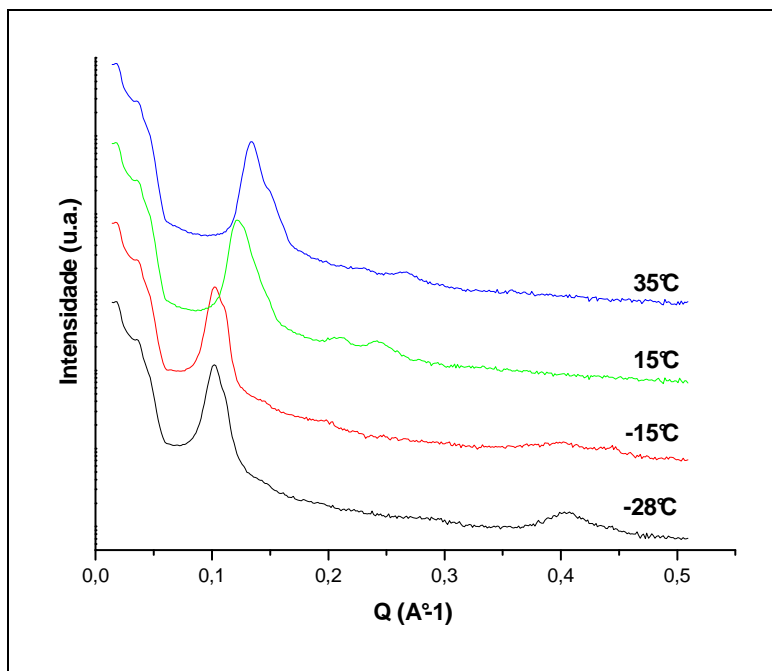


Figura 10: Padrões de difração de raios-X da DOPE/Tris.

3.2 MISTURA DOPE/CHEMS/TRIS

A adição de CHEMS a amostra de DOPE praticamente não modificou a temperatura da transição de fase L_{β}/L_{α} (Figura 9D), mas conduziu a um alargamento da endoterma acompanhada de redução da entalpia. No entanto, a -28°C a difração de raios-X mostrou uma bicamada lípídica de menor espessura na presença de CHEMS em relação a amostra de DOPE pura (52 e 62 Å, respectivamente). Além disso, a -15°C a presença de CHEMS conduziu a um maior organização das moléculas de DOPE o qual pode ser observado pela menor largura do pico de difração de raios-X medida a meia-altura (Figuras 10 e 11).

Essas observações estão coerentes com a hidratação máxima obtida para a amostra DOPE/CHEMS/Tris (0,6%) em relação a DOPE/Tris (3,0%). A menor hidratação da bicamada lipídica composta por DOPE/CHEMS/Tris resulta numa diminuição da d_{lam} . Além disso, a presença de CHEMS induziu o aumento da temperatura e diminuição da entalpia da transição de fase QII/HII (23°C) (Figura 9D). Isto pode ser explicado pelo impedimento da formação de ligações de hidrogênio intermolecular entre os grupamentos amônio e fosfato das moléculas de DOPE, pois a sua organização supramolecular hexagonal é decorrente das mesmas [32]. A menor interação entre as moléculas de DOPE na presença de CHEMS é também evidenciada pelo aumento das distâncias hexagonais observadas nas fases QII e HII em comparação com aquelas encontradas para a amostra de DOPE/Tris (75 e 65,5 Å e 52 e 49 Å, respectivamente). Essas dimensões confirmam a redução das interações entre as moléculas de DOPE na presença de CHEMS. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por De Oliveira e colaboradores (1998), no estudo das dimensões estruturais de DOPE na ausência e presença de ácido oléico, sob condições de baixa hidratação [33].

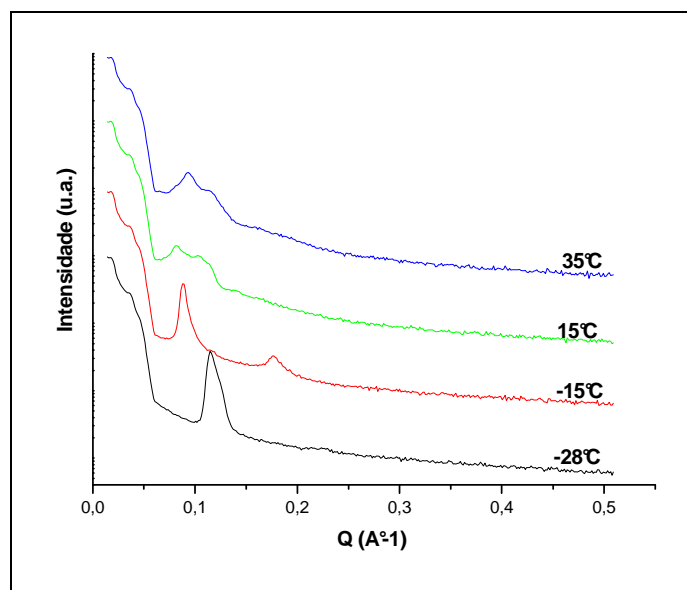


Figura 11: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/Tris.

3.3 MISTURA DOPE/CHEMS/DNA/TRIS

Após a adição de DNA na mistura de DOPE/CHEMS/Tris foram observados dois picos centrados em -26 e -21°C nas curvas de DSC mostradas na Figura 9C. Os padrões de raios-X revelaram a presença de duas séries de reflexões de Bragg nas relações de 1,2,3,4 e 1,2,3 a -30°C e -25°C ; 1,2,3,4 e 1,2 a -8°C , indicando a presença de uma organização lamelar nestes intervalos de temperatura (Figura 12). A análise de difração de raios-X revelou valores de distâncias lamelares idênticas nas temperaturas de -30°C e -25°C ($57,46 \text{ \AA}$), indicando a presença de uma mesma organização lamelar nestas temperaturas. A curva de DSC da amostra DNA/TRIS revelou igualmente a presença da transição de fase a -26°C , o que nos permitiu sugerir que essa transição seja relativa à fusão da água na presença de DNA juntamente com os íons do tampão TRIS. Além disso, a

existência de dois padrões de reflexões de Bragg demonstram a ocorrência de uma distribuição desigual das moléculas de DOPE na presença de moléculas de DNA. Como discutido por De Oliveira e colaboradores (1998), os grupamentos fosfato das moléculas de ácidos nucléicos podem interagir com os grupamentos amino das moléculas de DOPE, levando a obtenção de uma bicamada lipídica heterogênea [33]. Desta forma, pode ser sugerido a ocorrência de duas transições de fase L_{β}/L_{α} a -21°C referentes às distintas regiões presentes na bicamada lipídica. A transição de fase observada a -5°C refere-se à fusão das moléculas de água, como observado igualmente na amostra DNA/TRIS (dados não mostrados). A curva de DSC mostrou também a ocorrência de duas transições de fase a $10,6^{\circ}\text{C}$ e $18,7^{\circ}\text{C}$. Os padrões de raios-X obtidos revelaram duas séries de reflexões de Bragg iguais a 1,2,3 a 17°C e 1,2 a 30°C . Considerando a ocorrência das transições de fase L_{α}/Q_{II} e Q_{II}/H_{II} para a amostra de DOPE/Tris na mesma região de temperatura, supõe-se que estas transições observadas na amostra de DOPE/CHEMS/DNA/TRIS referem-se igualmente à esta transição de fase. A ausência das reflexões de Bragg nas razões de $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$ e $\sqrt{7}$ podem ser explicadas em função da baixa cristalinidade da amostra.

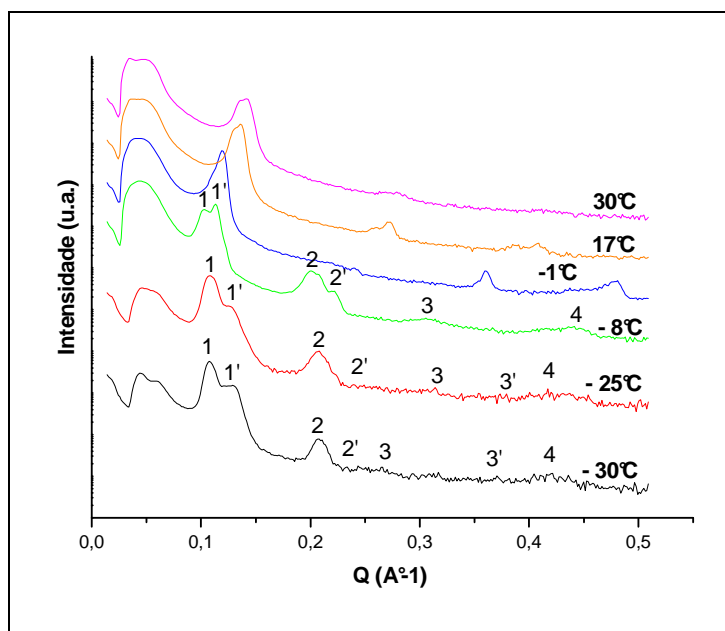


Figura 12: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/Tris. Os dois padrões de reflexão de Bragg relativos a organização lamelar da DOPE a -30°C , -25°C e -8°C são indicados como 1,2,3, 4; 1', 2', 3' e 1', 2'.

3.4. MISTURA DOPE/CHEMS/ β -CD⁺/TRIS

A curva de DSC da amostra contendo DOPE, CHEMS, β -CD⁺/TRIS (Figura 9A) não mostrou alteração da temperatura da transição de fase L_{β}/L_{α} (-26°C), a qual foi confirmada pelas reflexões de Bragg iguais a 1,2 à -15°C (Figura 13). No entanto, a presença de β -CD⁺ induziu à redução da entalpia da transição de fase L_{α}/Q_{II} e da temperatura da transição de fase Q_{II}/H_{II} (16°C) em comparação à amostra DOPE/CHEMS/TRIS (Figura 9D). O aparecimento de um único pico referente à transição de fase L_{α}/H_{II} da DOPE (16°C) foi atribuído a partir da obtenção das reflexões de Bragg na relação de $1, \sqrt{3}, \sqrt{7}$ à 30°C . A adição de β -CD⁺ na amostra DOPE/CHEMS/TRIS levou a obtenção de d_{lamelar} e $d_{\text{hexagonal}}$ menores em relação a amostra pura (d_{lamelar} igual a $59,23 \text{ \AA}$ e $61,99 \text{ \AA}$, a -15°C ;

$d_{\text{hexagonal}}$ igual a 43,90 Å e 48,58 Å a 30°C), respectivamente. Esses resultados indicam a existência de interações entre as moléculas de DOPE e β -CD+. Pode-se supor que as moléculas de β -CD+ se interpõem entre as moléculas de DOPE, ocorrendo interações eletrostáticas entre os seus grupamentos amônio e fosfato da DOPE. Como explicado anteriormente, a transição de fase observada a -6°C foi atribuída à fusão das moléculas de água.

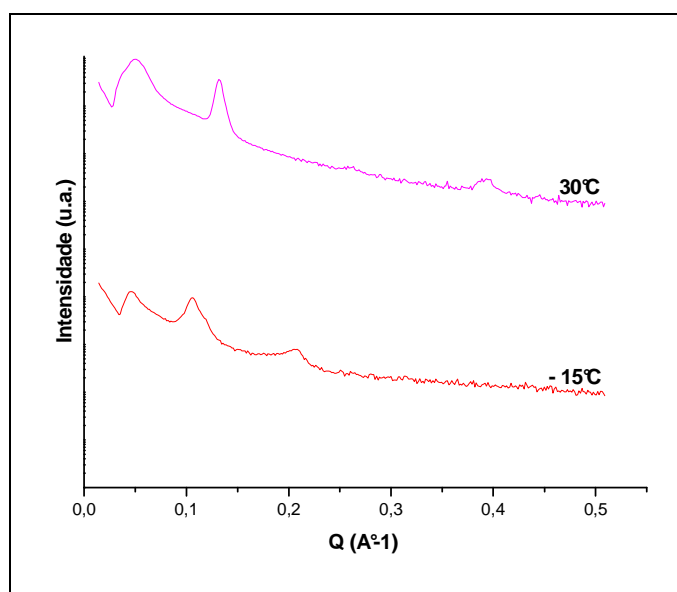


Figura 13: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/ β -CD⁺/TRIS

3.5 MISTURA DOPE/CHEMS/ β -CD⁺/DNA/TRIS

A adição do complexo β -CD⁺/DNA conduziu ao desdobramento do pico da transição de fase L_{β} / L_{α} da DOPE e ao seu deslocamento para temperaturas mais elevadas (-22°C e -14°C) (Figura 9E). A análise de difração de raios-X mostrou reflexões de Bragg de razão igual a 1,4 a -30°C, -18°C e -5°C (Figura 14). Isto

indica a formação de distintas fases lamelares gel e fluida na presença do complexo β -CD⁺/DNA. A distribuição heterogênea das moléculas de DOPE na bicamada lipídica é provavelmente resultante de interações eletrostáticas entre os grupamentos fosfato das moléculas de DNA e amino das moléculas de DOPE e/ou os grupamentos amino das moléculas de β -CD⁺ e os fosfato das moléculas de DOPE. A curva de DSC mostrou também a ocorrência de uma transição de fase a 13°C (Figura 9E). O padrão de raios-X a 25°C revelou razões de reflexões de Bragg iguais a 1,3 e a presença de picos de difração alargados, indicando a baixa cristalinidade da amostra. Como já discutido para a amostra DOPE/CHEMS/DNA/TRIS, supõe-se que esta transição de fase refere-se à L_α/H_{II} e a ausência das reflexões de Bragg nas razões de $\sqrt{3}$, 2 e $\sqrt{7}$ é decorrente do estado desorganizado da amostra.

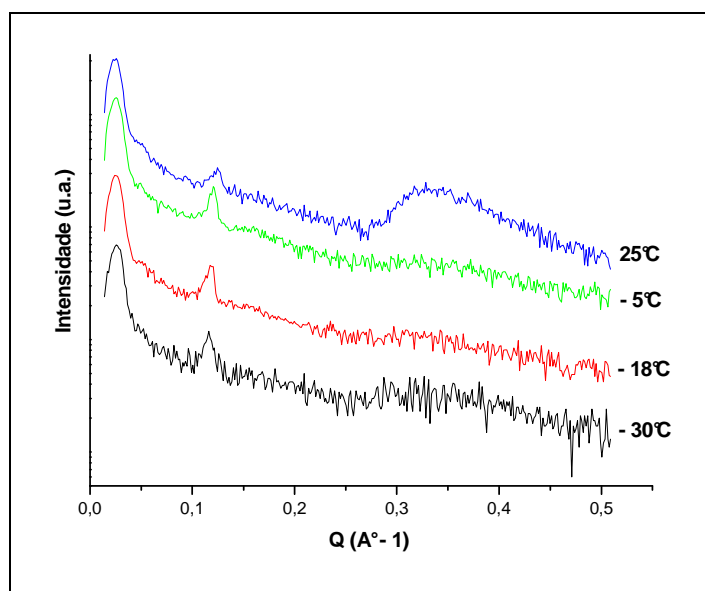


Figura 14: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD⁺/TRIS.

CAPÍTULO II

ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO O COMPLEXO β -CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA NUM MEIO HIDRATADO

1. INTRODUÇÃO

No capítulo I dessa dissertação foi investigada as transições de fase da DOPE na presença do complexo β -CD⁺ em condições de baixa hidratação, o que evidenciou a existência de interações entre os componentes dos lipossomas pH-sensíveis. Continuando este estudo, este capítulo trata da investigação dessas interações num meio hidratado, o que permite maior semelhança com a formulação de lipossomas original .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

O Agar-ágar, a triptona e o extrato de levedura foram adquiridos da ISO FAR (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) e o Kit “CONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System” foram comprados da GIBCO™ (Nova York, EUA). A suspensão de *Escherichia coli* DH5 α foi gentilmente cedida pelo Prof. Jorge Luiz Pesquero do Laboratório de Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). A ampicilina foi obtida da Fisher Scientific (Nova Jersey, EUA). O plasmídeo pGEM-T e o padrão Lambda DNA/EcoRI- HIND III foram comprados da Promega (Madison, EUA). A 6-monodesoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina (β -CD⁺)

foi adquirida da Cyclolab R&D Laboratory (Budapeste, Hungria). A 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) foi gentilmente cedida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O hemisuccinato de colestera (CHEMS), a N-2-hidroxiethylpiperazina (HEPES) e o tampão tris-(hidroximetil)aminometano (Tris) foram comprados da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA). As membranas de polycarbonato foram adquiridas da MILLIPORE (Bedford, EUA).

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

1,5g de ágar-ágar foram dissolvidos em 100mL do meio LB pH 7,4 (2,0g de triptona, 1,0g de extrato de levedura, 1,0g de NaCl) e então, o meio LB-Ágar foi esterilizado à 121°C durante 15 minutos. Após o resfriamento do meio, adicionou-se ao mesmo 40µL de IPTG, 100µL de ampicilina e 160µL de X-Gal e esta mistura foi adicionada às placas de petri.

2.3. OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

O plasmídeo comercial pGEM-T de aproximadamente 3 Kb , contendo o gene Lac-Z, responsável pela expressão da enzima β-galactosidase (Figura 15), foi amplificado utilizando-se colônias de *Escherichia coli* competentes .

Inicialmente, 100µL de *Escherichia coli* DH5α foram adicionados a 1µg da solução de pGEM-T e esta mistura foi submetida à 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, 400µL do meio LB pH 7,4 foram adicionados à suspensão de bactérias e estas foram incubadas a 37°C em THERMOMIXER 5436, (Eppendorf, Hamburgo, 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, 200mL do meio LB foram preparados e esterilizados à 121°C por 15 minutos e após o resfriamento, 50µL de ampicilina 0,1mg/mL foram adicionados. Em seguida, uma colônia de *Escherichia Coli* foi transferida para esse meio, sendo incubada *overnight* à 37°C, sob agitação em shaker (TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Finalmente, o plasmídeo pGEM-T foi purificado empregando-se o Kit "CONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System". A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria no UV (Hitachi Instruments, Illinois, EUA), mediante a determinação da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, respectivamente, e sua pureza foi avaliada utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1,0 g% (p/v), empregando-se como referência o padrão Lambda DNA/*EcoRI*- HIND III.

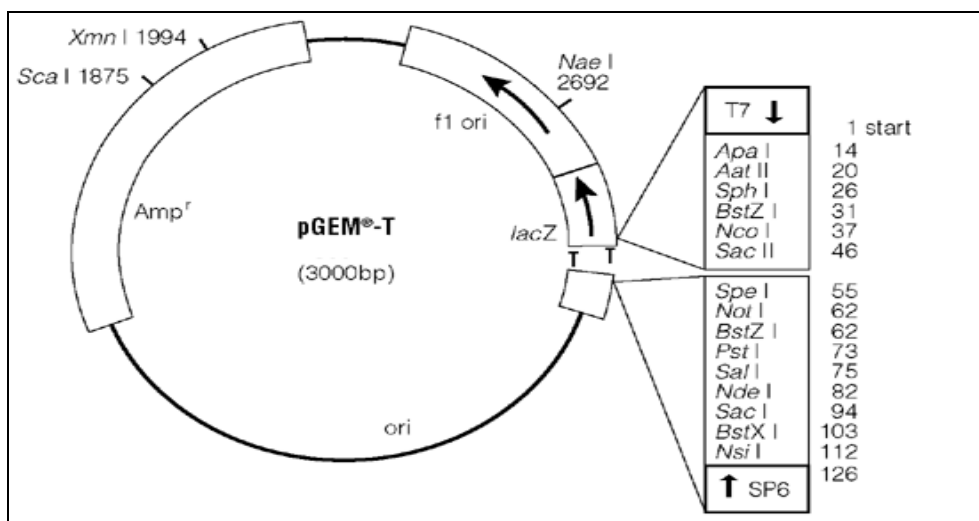


Figura 15 - Estrutura esquemática do plasmídeo pGEM-T.

2.4. ENCAPSULAÇÃO DO COMPLEXO B-CICLODEXTRINA CATIÔNICA/DNA EM LIPOSSOMAS PH-SENSÍVEIS

A encapsulação do complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA (β -CD⁺/DNA) em lipossomas pH-sensíveis foi realizada mediante o emprego do método de evaporação em fase reversa [18].

2.4.1. Método de evaporação em fase reversa

2.4.1.1. Obtenção do complexo β -CD⁺/DNA

De uma solução contendo a β -CD⁺ em tampão Tris pH 7,4, numa concentração de 1mg/mL, foi retirada uma alíquota de 100 μ L que foi adicionada a 2,0 μ L da solução de DNA (concentração igual a 12,1 μ g/ μ L). O volume dessa

mistura foi completado para 1mL com tampão Tris pH 7,4, e foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas [34].

2.4.1.2. 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 10mM 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 24,2 μ g/mL [34]. A mistura obtida foi, então, submetida ao vórtex (IKA, Wilmington, EUA) durante 5 minutos, produzindo uma emulsão do tipo água/óleo (A/O).

2.4.1.3. Obtenção dos lipossomas

Posteriormente, a emulsão foi submetida à evaporação sob vácuo (ROTAVAPOR FISATOM, São Paulo, 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 150000g, à 4°C, durante 80 minutos.

2.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HIDRATADAS

Foram preparados 4 tipos de lipossomas (4 amostras de cada) para o estudo das interações em condições de alta hidratação: lipossomas brancos, lipossomas contendo o DNA livre, lipossomas contendo a β -CD⁺ e lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA. Após a centrifugação, os pellets obtidos foram transferidos para tubos eppendorf e concentrados utilizando nitrogênio para evaporação da água até se atingir um teor de hidratação de 7 %, sendo essas amostras denominadas de hidratadas [35 e 37]. As amostras concentradas foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises. Essas amostras foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X.

2.6. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

As análises calorimétricas foram realizadas no instrumento DSC 2910 Modulated TA Instruments (New Castle, EUA), no intervalo de temperatura de -50°C a 50°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C/min .. O índio foi utilizado para calibração da temperatura e da entalpia. Os dados obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição foram definidas pela posição dos picos observados nas curvas de DSC.

2.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Para a análise de difração de raios-X as amostras hidratadas foram retiradas dos eppendorfs e depositadas no centro de uma placa de silício. As análises foram realizadas na estação experimental D10A-XRD2 (difração de raios-X de alta resolução) do Laboratório Nacional de Luz Síncroton ($\lambda = 1,54982 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas num intervalo de temperatura de -30°C a 60°C , utilizando para isso um sistema Peltier e um banho com água e etilenoglicol para o resfriamento do porta-amostra. Os padrões de difração de raios-X foram obtidos após equilíbrio térmico e exposição da amostra ao tempo de 350s.

2.8. DETERMINAÇÃO DA pH-SENSIBILIDADE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO $\beta\text{-CD}^+/\text{DNA}$

O estudo da pH-sensibilidade é relevante, uma vez que, após a endocitose dos lipossomas pelas células, ocorre a diminuição do pH até a sua fusão com os lisossomas celulares, responsáveis pela digestão do material endocitado. É importante lembrar que os lipossomas pH-sensíveis se desestabilizam liberando o material encapsulado durante essa diminuição progressiva de pH, mas antes de ocorrer a fusão com os lisossomas. Geralmente o valor de pH dos endossomas antes dessa fusão fica em torno de 4,5 – 5,0.

A pH-sensibilidade dos lipossomas contendo ou não o complexo $\beta\text{-CD}^+/\text{DNA}$ foi demonstrada através da determinação da variação do diâmetro e do potencial zeta das vesículas em função do pH utilizando-se o auto-titulador do equipamento Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). Para a

realização da auto-titulação foi empregada uma solução de ácido clorídrico 0,1M e a faixa de pH investigada foi de 7,4 a 4,0. As amostras foram preparadas em triplicata e diluídas em tampão Tris pH 7,4 para cada curva obtida. Para as medidas de diâmetro das vesículas foram preparadas amostras contendo 2 mL de lipossomas (branco ou com o complexo β -CD⁺/DNA) em 40 mL de tampão Tris pH 7,4 e para as medidas do potencial zeta preparou-se amostras contendo 600 μ l de lipossomas (branco ou com complexo β -CD⁺/DNA) também em 40 mL do mesmo tampão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Após transformação das colônias de *E. coli* com o plasmídeo pGEM-T, constatou-se que tais colônias apresentavam coloração azul, sendo essa o indicativo de que houve, realmente, a proliferação do plasmídeo no interior das bactérias. O plasmídeo em questão contém o gene Lac-Z responsável pela expressão da enzima β -galactosidase (β -Gal), 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. Uma vez expressa no interior das células bacterianas, a β -Gal cliva as moléculas de X-Gal presentes no meio, o que origina o aparecimento de coloração azul.

Para a purificação do DNA, foi utilizado o Kit Maxiprep. Com o uso deste, há a possibilidade de separação das moléculas do plasmídeo de outras moléculas oriundas das células de *Escherichia coli*, como proteínas, RNA's e o próprio DNA bacteriano. Este procedimento fundamenta-se no uso de uma resina de troca iônica para que haja 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 800mM de NaCl e 100mM 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 1,25M de NaCl e 100mM 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 mediante a determinação da razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 260nm ($\bar{A}1$) e 280nm ($\bar{A}2$), uma vez que estes comprimentos de onda são específicos para ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente. Nos experimentos, as razões $\bar{A}1/\bar{A}2$ mostraram-se satisfatórias, apresentando valores compreendidos entre 1,6-1,8, os quais garantem a ausência de contaminação protéica no DNA de interesse [36].

Finalmente, a quantidade total de DNA obtida nos diferentes experimentos foi de aproximadamente 500 μ g.

A avaliação da pureza do plasmídeo pGEM-T foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1,0 g% (p/v), sendo utilizado como referência o padrão Lambda DNA/*Eco*RI-*HIND* III. A Figura 16 mostra o gel obtido, confirmando que a banda referente ao plasmídeo pGEM-T possui 3Kb.

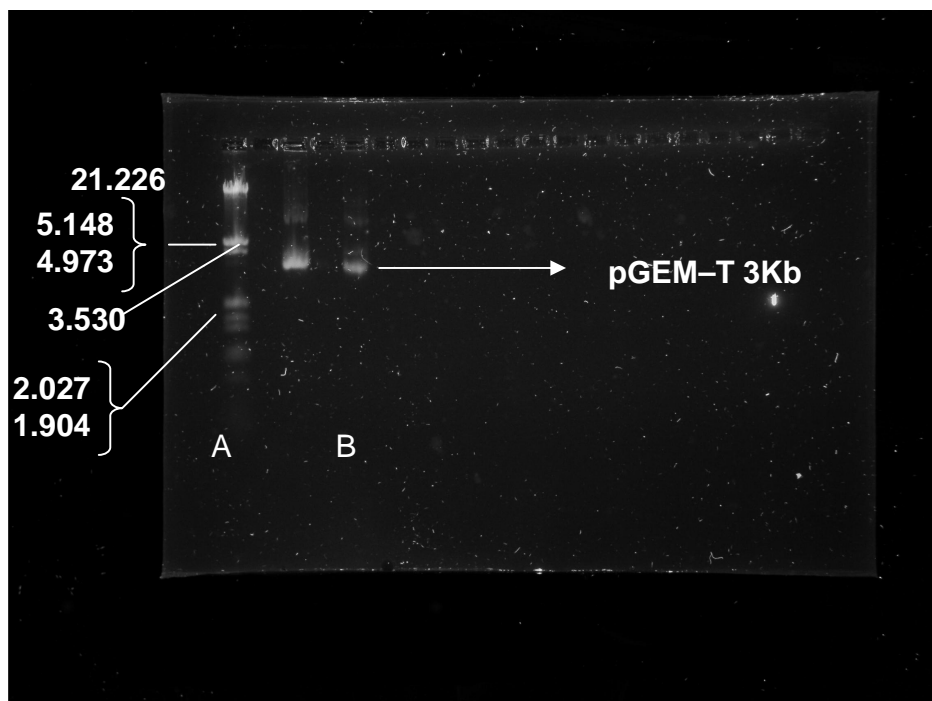


Figura 16: Gel de agarose contendo o padrão Lambda DNA/*Eco*RI-*HIND* III (A) e o plasmídeo pGEM-T (B).

3.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DE VARREDURA (DSC) E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

3.2.1 Mistura DOPE/Tris

A curva de DSC da amostra de DOPE/Tris hidratada (Figura 17) apresentou quatro temperaturas de transição de fase a -35°C , $-1,2^{\circ}\text{C}$, $10,4^{\circ}\text{C}$ e $19,2^{\circ}\text{C}$. O difratograma (Figura 18) mostrou razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2 a -29°C e duas séries iguais a 1,2,3,4 e $1, \sqrt{3}$ a -2°C , o que indica a ocorrência da transição de fase lamelar L_{β}/L_{α} da DOPE e a presença de fase hexagonal. A 5°C , 15°C e 25°C os padrões de reflexões de Bragg foram iguais a $1, \sqrt{3}$ indicando a ocorrência de transições não lamelares. Como observado para a amostra de DOPE/Tris em baixo teor de hidratação, pode-se atribuir às transições L_{α}/Q_{II} e Q_{II}/H_{II} .

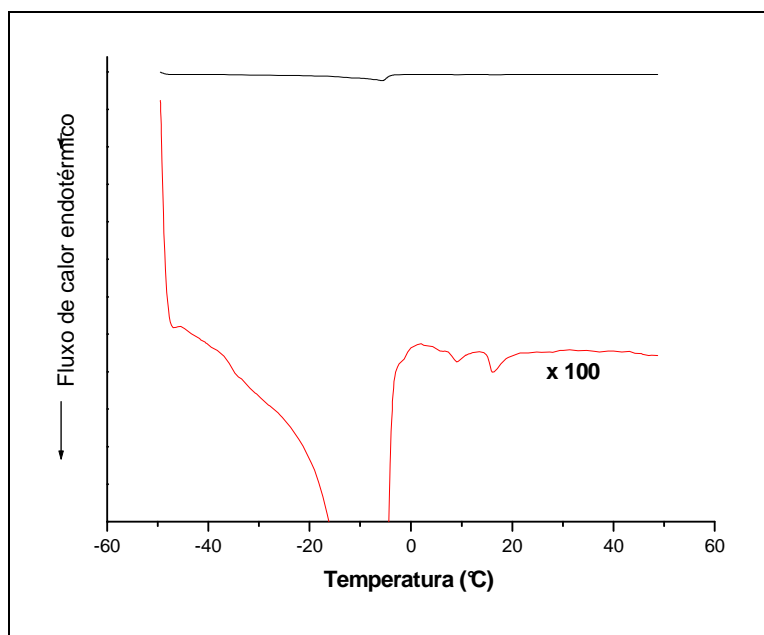


Figura 17: Curva de DSC de DOPE/Tris

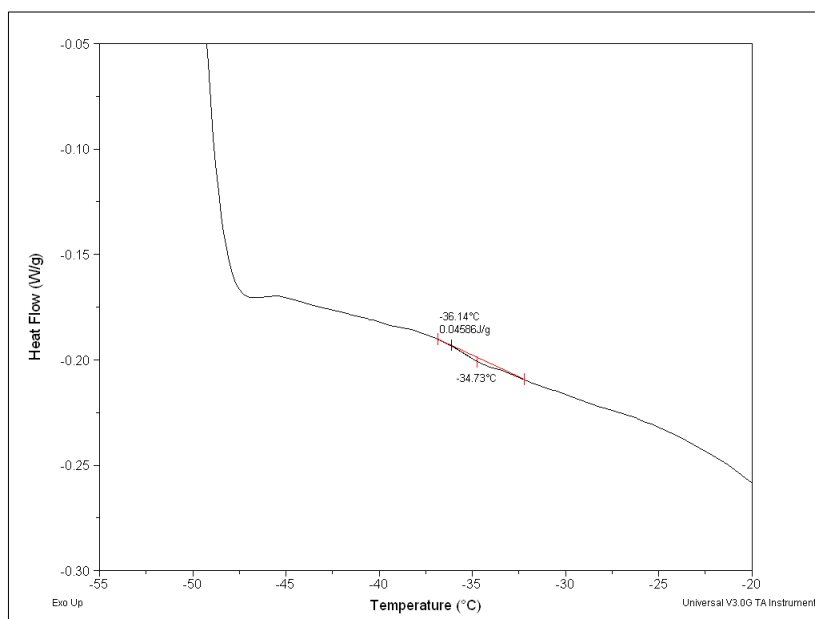


Figura 17 A: Ampliação da curva de DSC de DOPE/Tris

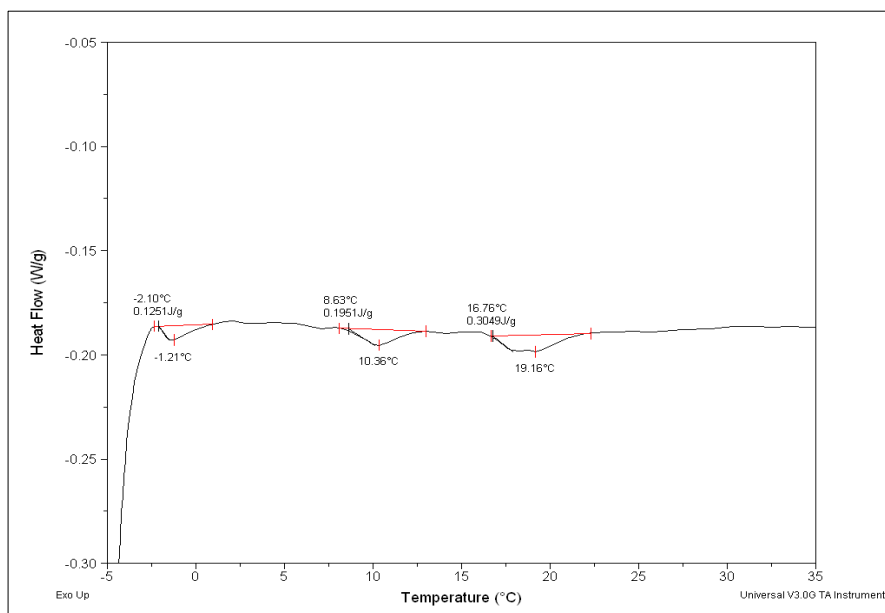


Figura 17B: Ampliação da curva de DSC de DOPE/Tris

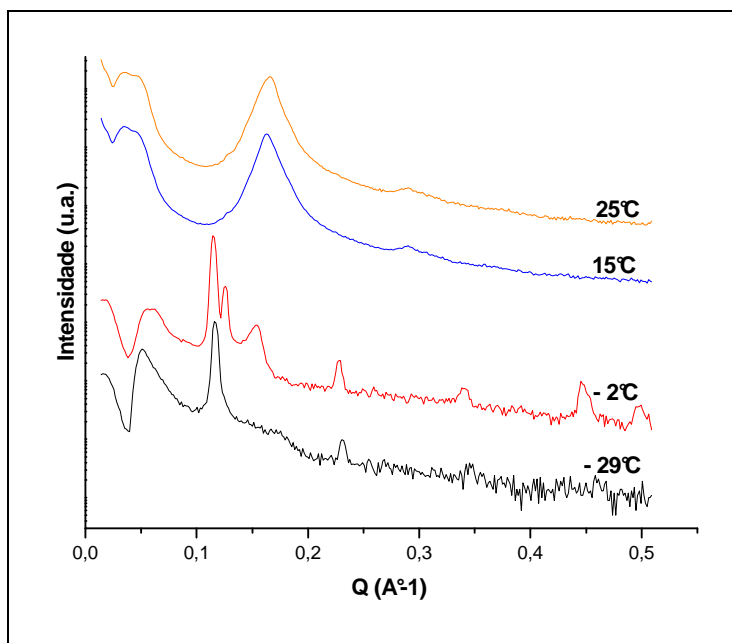


Figura 18: Padrões de difração de raios-X de DOPE/Tris.

3.2.2. Mistura DOPE/CHEMS/TRIS

A análise térmica dessa amostra possibilitou a identificação de três temperaturas de transição de fase a $-19,5^{\circ}\text{C}$, $7,4^{\circ}\text{C}$ e $15,4^{\circ}\text{C}$ (Figura 19). O difratograma mostrou razões de reflexão de Bragg iguais a 1,3,4 a -30°C e 1,2 a 5°C , o que indica a ocorrência da transição de fase L_{β}/L_{α} da DOPE (Figura 20). Por tanto, a adição de CHEMS à amostra DOPE/Tris acarretou um aumento da temperatura da transição de fase L_{β}/L_{α} da DOPE, mostrando que a sua presença modifica a organização destas moléculas, tornando a bicamada lipídica mais rígida. O núcleo esteróide das moléculas de CHEMS interage com a cadeia acila das moléculas de DOPE, reduzindo o movimento dos átomos de carbono, e conseqüentemente, promovendo maior condensação da bicamada lipídica, como discutido por New (1990). Análises de difração de raios-X realizadas a 15°C e 50°C não mostraram padrões de reflexões de Bragg bem definidos. Isto pode ser decorrente da fusão das moléculas de água, provocando uma desorganização da bicamada lipídica, e conseqüentemente, reduzindo o grau de cristalinidade da amostra. Entretanto, levando-se em consideração as transições de fase observadas para a amostra de DOPE/Tris no estado de menor hidratação, pode-se supor que estas transições de fase sejam referentes à formação de fases não lamelares (Q_{II} e H_{II}).

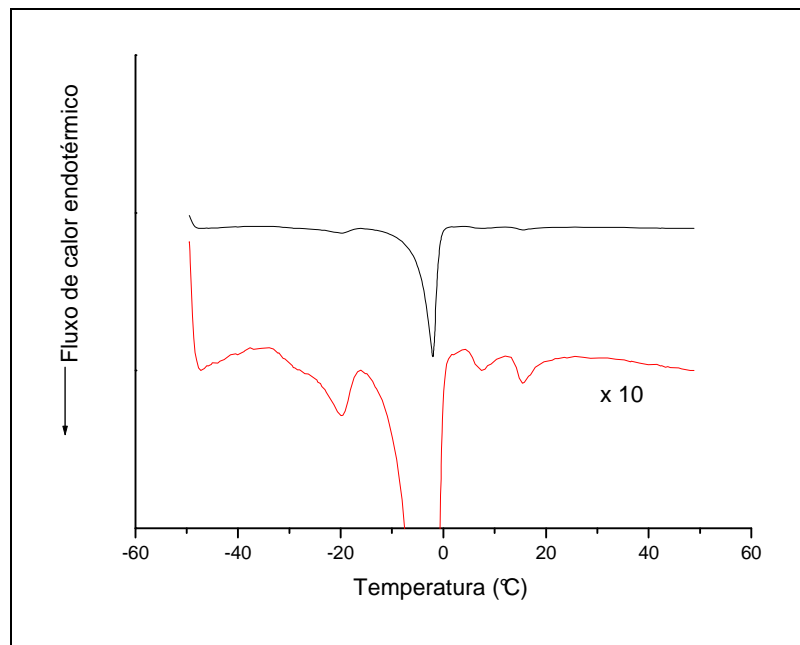


Figura 19: Curva de DSC de DOPE/CHEMS/Tris.

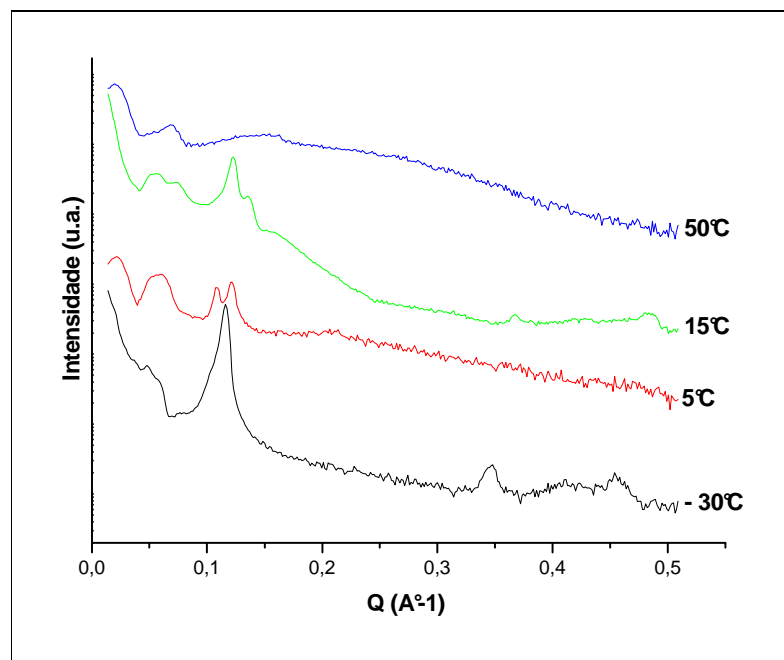


Figura 20: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/Tris.

3.2.3. Mistura DOPE/CHEMS/DNA/TRIS

A curva de DSC da amostra de DOPE/CHEMS/DNA/Tris hidratada apresentou duas temperaturas de transição de fase, -18°C e 31°C (Figura 21). O difratograma revelou razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2,4 e 1,3;4 a 5°C , o que indica a ocorrência da transição de fase L_{β}/L_{α} da DOPE (Figura 22). A presença de DNA promoveu o aumento da temperatura da segunda transição de fase da DOPE em relação à amostra DOPE/CHEMS (15°C). Este aumento pode ser resultante da existência de interações entre os grupamentos fosfato das moléculas de DNA e os grupamentos amino das moléculas de DOPE, favorecendo a manutenção da organização lamelar. Estas interações podem conduzir à uma distribuição heterogênea das moléculas de DOPE na bicamada lipídica o que explica as duas séries de reflexões de Bragg encontradas para fase L_{α} . A análise de difração de raios-X apresentou apenas dois picos de difração a $45,8$ e $42,2 \text{ \AA}$ a 50°C , não sendo possível determinar razões de reflexões de Bragg. Este fato deve-se provavelmente à fusão das moléculas de água, o que contribui com a desorganização da bicamada lipídica. Entretanto, a presença destes picos de difração reforçam que as moléculas de DNA interagem com as moléculas de DOPE, levando a uma distribuição heterogênea das moléculas de DOPE em suas distintas organizações supramoleculares (fases lamelar e hexagonal), o que não ocorre na amostra constituída apenas por DOPE/CHEMS/Tris a 50°C (ausência de picos de difração de raios-X).

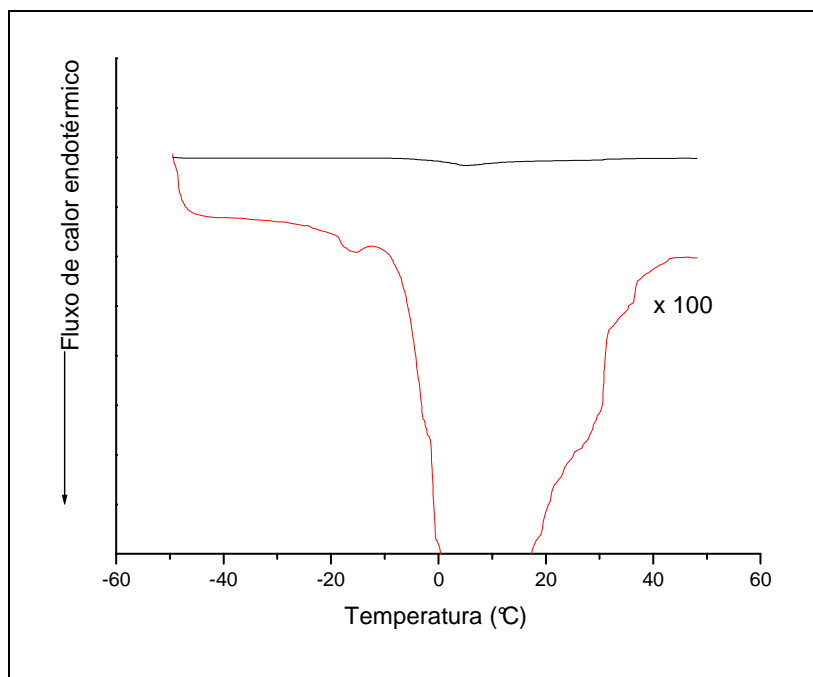


Figura 21: Curva de DSC da amostra DOPE/CHEMS/DNA/Tris.

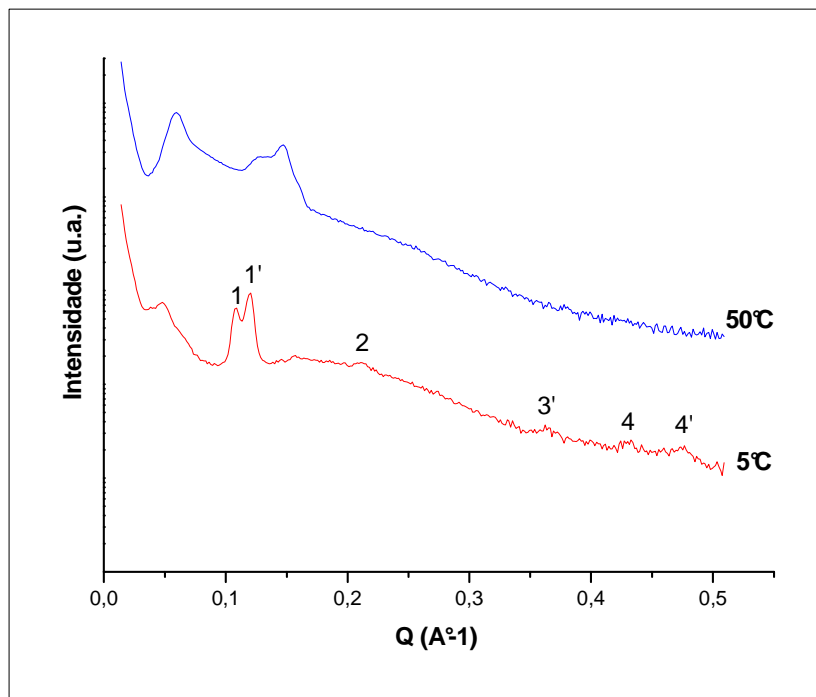


Figura 22: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/DNA/Tris. O padrão de reflexão de Bragg relativo a organização lamelar da DOPE a 5°C é o indicado como 1,2, 4 e 1', 3', 4'.

3.2.4. Mistura DOPE/CHEMS/ β -CD+/TRIS

A curva de DSC dessa amostra apresentou apenas uma endoterma cuja a temperatura do pico está centrada a $-17,6^\circ\text{C}$ (Figura 23 e 23 A). O difratograma revelou duas séries de reflexões de Bragg iguais a 1,2 e 1,3 a 5°C , confirmando a ocorrência da transição de fase L_β/L_α da DOPE (Figura 24). No entanto, na presença de β -CD+ nenhuma transição de fase foi observada por calorimetria exploratória diferencial acima de 0°C . Além disso, a análise de raios-X apresentou

um pico alargado de difração a 50°C, não permitindo a identificação da organização supramolecular da DOPE devido provavelmente à fusão da água.

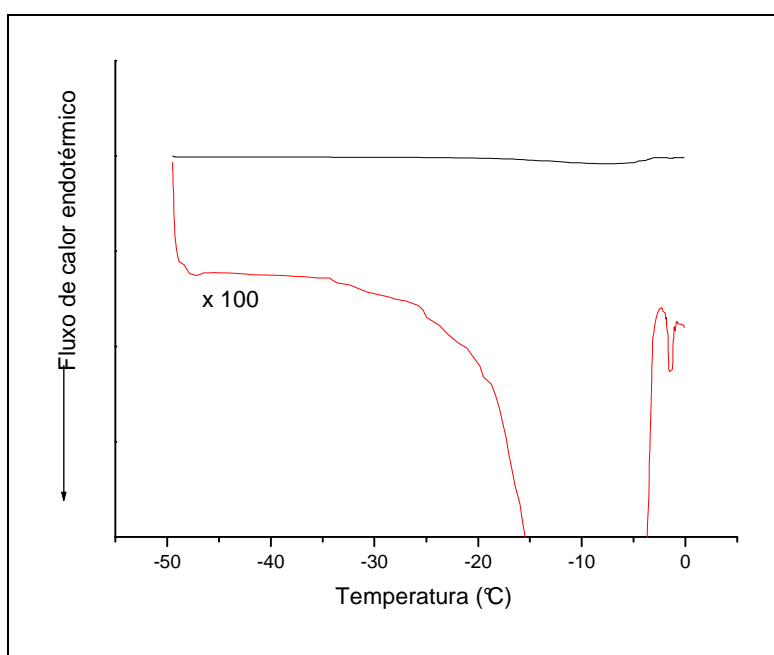


Figura 23: Curva DSC da amostra DOPE/CHEMS/ β -CD+/Tris.

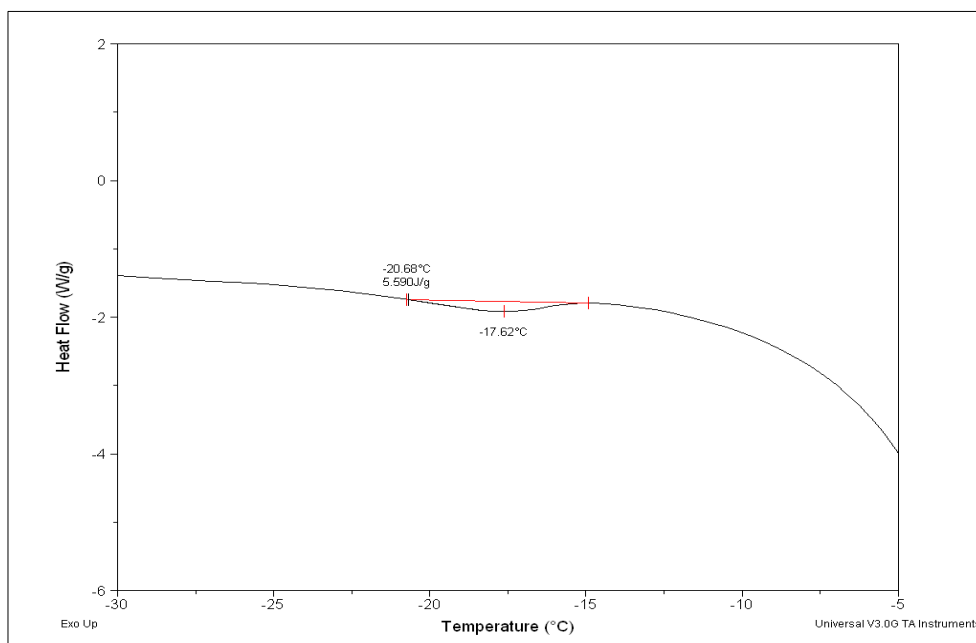


Figura 23 A: Ampliação da curva de DSC da amostra DOPE/CHEMS/ β -CD+/Tris.

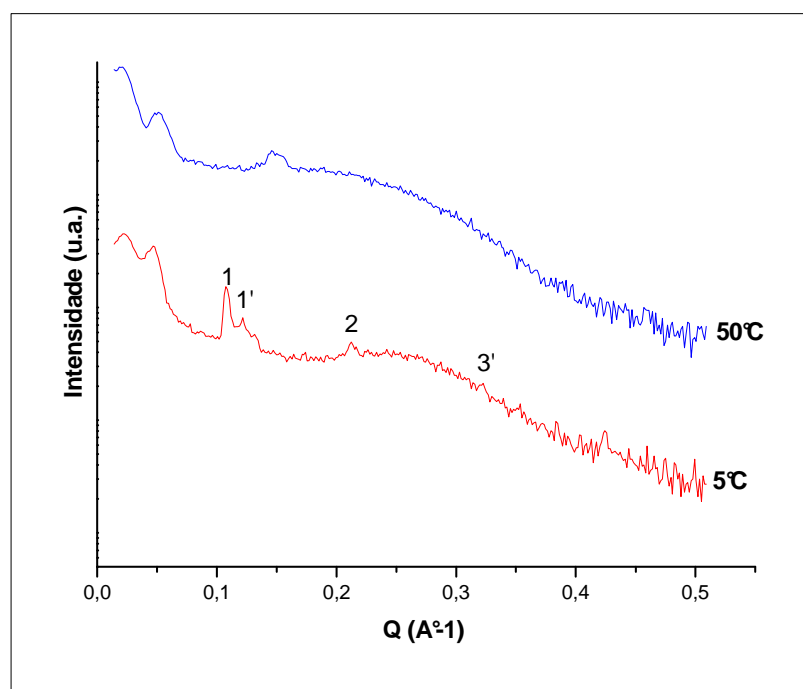


Figura 24: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/ β -CD+/Tris. O padrão de reflexão de Bragg relativo a organização lamelar da DOPE a 5°C é o indicado como 1,2 e 1', 3'.

3.2.5. Mistura DOPE/CHEMS/DNA/ β -CD+/TRIS

A curva de DSC dessa amostra apresentou temperaturas de transição de fase em -18°C e 14°C (Figura 25). O difratograma revelou a presença de reflexões de Bragg na razão igual a 1,4 a -30°C (Figura 26), indicando a ocorrência da transição de fase L_{β}/L_{α} da DOPE. As análises de difração de raios-X realizadas a 5°C e 50°C mostraram apenas a presença de picos de difração alargados, portanto, não sendo possível a determinação das razões de reflexões de Bragg. A incorporação do complexo β -CD+/DNA à bicamada lipídica constituída por DOPE/CHEMS aumentou ligeiramente a temperatura de transição de fase L_{β}/L_{α} ($-18,0^{\circ}\text{C}$ versus $-19,5^{\circ}\text{C}$) e conduziu ao aparecimento de apenas um pico de transição de fase a 14°C o qual provavelmente deve-se à formação de fase não lamelar.

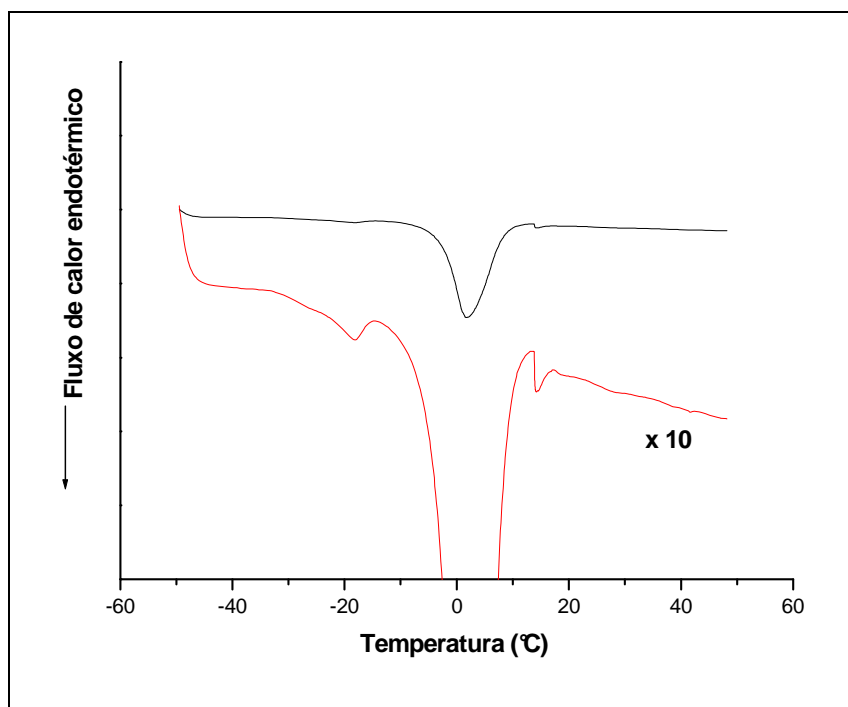


Figura 25: Curva DSC da amostra DOPE/CHEMS/DNA/β-CD+/Tris.

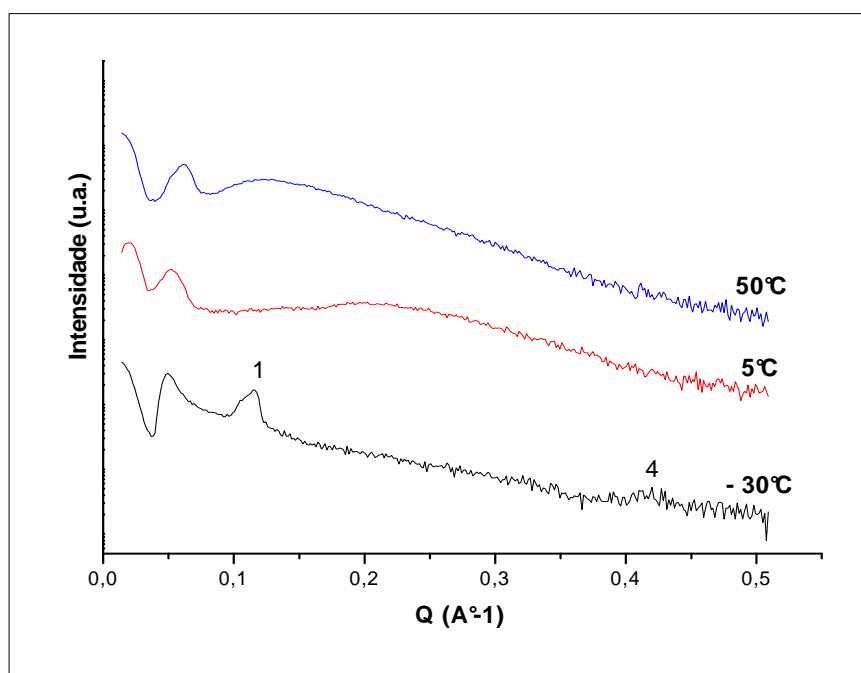


Figura 26: Padrões de difração de raios-X de DOPE/CHEMS/β-CD+/DNA/Tris. O padrão de reflexão de Bragg relativo a organização lamelar da DOPE a -30°C é o indicado como 1,4.

3.3. DETERMINAÇÃO DA pH-SENSIBILIDADE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO β -CD⁺/DNA

Após o procedimento de auto-titulação dos lipossomas foram obtidas curvas de variação do diâmetro das vesículas e do potencial zeta em função do pH (Figuras 27 e 28). Quanto aos lipossomas brancos pôde-se observar o aumento do diâmetro das vesículas à medida que o pH diminuiu, indicando que ocorre uma desestabilização da bicamada lipídica devido a protonação do constituinte CHEMS. Próximo ao pH = 4,0, o diâmetro das vesículas se mostrou muito grande em relação aos demais indicando que não havia mais lipossomas intactos, mas agregados lipídicos, fato confirmado visualmente pela precipitação do material.

Os dados obtidos a partir da titulação dos lipossomas brancos em função do potencial zeta também confirmaram que com a diminuição do pH ocorre uma desestabilização da bicamada lipídica decorrente da protonação do constituinte CHEMS, o que é representado pelo aumento dos valores do potencial zeta, ou seja, valores menos negativos do que aquele apresentado na amostra original com pH = 7,4. Também com essa amostra foi observada a precipitação de material em pH próximo de 4,0.

Os dados obtidos após as titulações dos lipossomas contendo o complexo β -CD⁺/DNA se mostraram bastante semelhantes àqueles dos lipossomas brancos. O ponto de interseção das tangentes das curvas de variação do diâmetro em função do pH para as amostras de lipossomas brancos e aqueles contendo o complexo β -CD⁺/DNA indica que os valores de pH no qual ocorre um

aumento brusco do diâmetro das vesículas é de 5,7 e 5,3, respectivamente. Também foi observada a precipitação dos lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA em pH próximo de 4,0. Em relação à variação do potencial zeta para a amostra de lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo β -CD⁺/DNA, observa-se também um comportamento semelhante aos lipossomas brancos, ou seja, ocorre um aumento dos valores do potencial zeta à medida que o pH diminui, decorrente da protonação do constituinte CHEMS. As duas curvas da figura 28 não apresentam diferenças estatísticas (ANOVA $p > 0,05$), portanto esse estudo sugere que a presença do complexo β -CD⁺/DNA nos lipossomas pH-sensíveis não promove modificações na bicamada lipídica capazes de alterar a pH-sensibilidade.

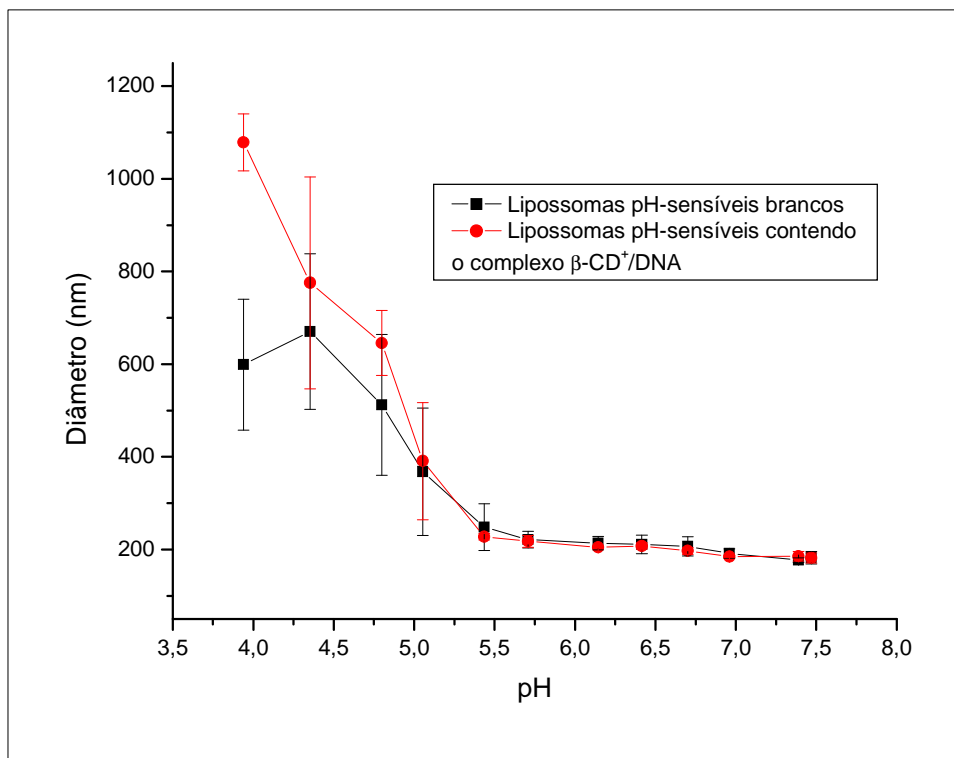


Figura 27: Variação do diâmetro de lipossomas pH-sensíveis em função do pH.

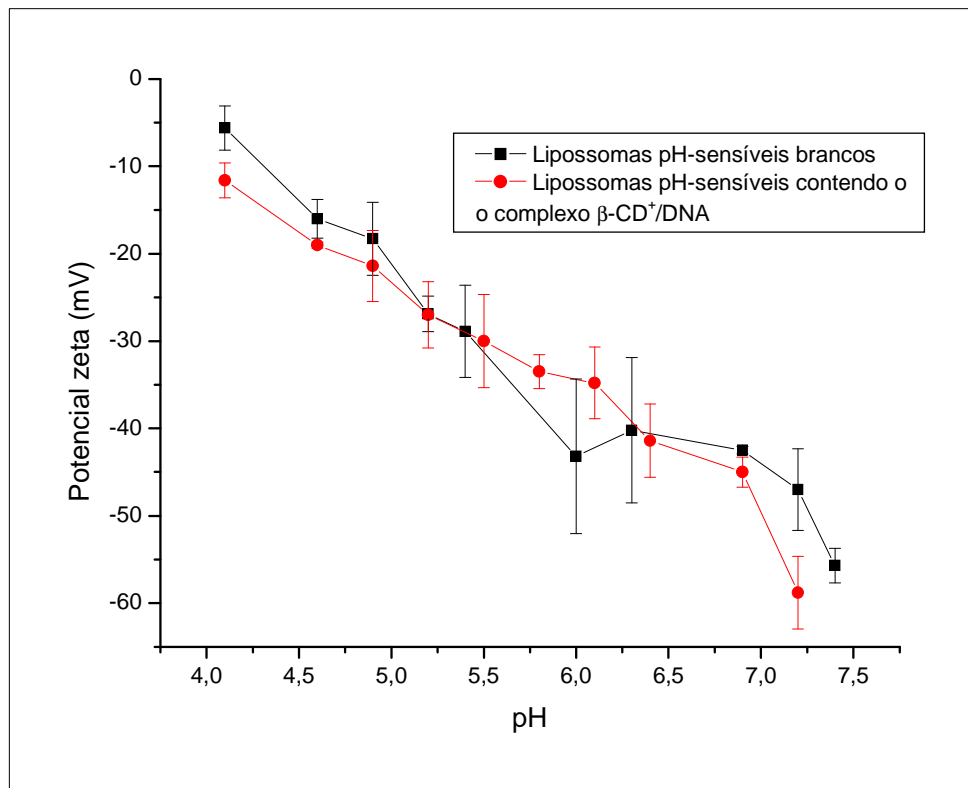


Figura 28 :Variação do potencial zeta de lipossomas pH-sensíveis em função do pH.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Com o objetivo de estudar as interações entre os componentes dos lipossomas pH-sensíveis foram realizadas análises de DSC e difração de raios $-X$ que revelaram a existência de interações entre DOPE e o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA levando a ocorrência de modificações supramoleculares, eventos importantes para se compreender a eficiência dos lipossomas pH-sensíveis em estudos biológicos. Entretanto, o estudo da determinação da pH-sensibilidade revelou que as interações existentes entre o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA e a bicamada lipídica não comprometem o comportamento da pH-sensibilidade dos lipossomas.

Portanto, como perspectiva desse trabalho, faz-se necessário dar continuidade a investigação das transições de fase apresentadas por esse sistema lipídico contendo o complexo β -ciclodextrina catiônica/DNA quando em contato com as proteínas do meio biológico. Essa investigação é importante para o entendimento e otimização dos estudos de transfecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] STEIN, C.A.; CHENG, Y.-C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents- is the bullet really magical?. **Science**, n. 261, p. 1004-1012, 1990.
- [2] AKHTAR, S.; AGRAWAL, S. *In vivo* studies with antisense oligonucleotides. **Tips**, v.18, p. 12-18, 1997.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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. **Intenational Journal of Pharmaceutics**, v. 139, p. 69-78, 1996.
- [6] LEE, R. J.; HUANG, L. Lipid vector systems for gene transfer. **Critical ReviewsTM in Therapeutical Drug Carrier Systems**, v. 14, p. 173-206, 1997.
- [7] LESAGE, D.; CAO, A.; BRIANE, D.; LIEVRE, N.; COUDERT, R.; RAPHAEL, M.; SALZMANN, J.L.; Taillandier, 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.

- [8] 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.
- [9] 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, 1995. P. 201-214.
- [10] LEGENDRE, J-Y.; JR., F.C.S. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1235-1242, 1992.
- [11] MAHATO, R.I.; SMITH, L.C.; ROLLAND, A. Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. **Advances in Genetics**, v. 41, p .95-156, 1999
- [12] Liu, Y.; FONG, S; DEBS, R.J. Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. **Methods in Enzymology**, v. 373, p. 536-550, 2003
- [13] 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.
- [14] 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
- [15] 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.

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

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

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

[19] 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.

[20] GULINO, P.M.; GRANTHAM, F.H.; SMITH, S.H.; HAGGERTY, A.C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, p. 857-869, 1965.

[21] ELLENS, H., BENTZ, J., SZOKA, F. C. Ph-induced destabilization of phosphatidylethanolamine containing liposomes: role of bilayer contact. **Biochemistry**, v. 23, p.1532-1538, 1984.

[22] COLLINS, D., LITZINGER, D. C., HUANG, L. Structural and functional comparisons of phosphatidylethanolamines and three different diacylsuccinylglycerols. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1025, p.234-242, 1990.

[23] 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.

[24] GUNER, S.M., CULLIS, P.R., HOPE, M.J., TILCOCK, C.P.S. Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. **Annu. Rev. Biophys. Chem.** 14,211-238, 1985.

[25] SIEGEL, D.P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases. I. Mechanism of the $L\alpha'$ H_{II} phase transitions. **Biophysical Journal** , 49, 1155-1170, 1986a.

[26] 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**, 49, 1171-1183, 1986b.

[27] LIS, L., MACALISTER, M., FULLER, N., RAND, R.P., PARSEGIAN, V. A. Measurements of the lateral compressibility of several phospholipid bilayers. **Biophysical Journal**, 37,657-666, 1982.

[28] REISS-HUSSON, F. structure of liquid-crystalline phases of different phospholipids, monoglycerides, sphingolipids in the absence or presence of water. **J. Mol. Biol.** 25,363-382.

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

[30] DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, p. 1033-1046, 2004.

[31] CRYAN, S., 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.

[32] 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.

[33] DE 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-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1372, p. 301-310, 1998.

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

[35] RAND, R.P., FULLER, N.L. Structural Dimensions and Their Changes in a Reentrant Hexagonal-Lamellar Transition of phospholipids, **Biophysical Journal**, v.66, p. 2127-2138, 1994.

[36] 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.

[37] DE OLIVEIRA, M.C., ROSILIO, V., LESIEUR, P., BOURGAUX, C., COUVREUR, P., OLLIVON, M., DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between

DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. **Biophys Chem.**, v. 87, p.127-37, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)