FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS CATIÓNICOS LIPOSSOMA-DNA PARA TERAPIA GÉNICA EM OSTEOBLASTOS

ANDREIA CABRAL DE OLIVEIRA

Licenciada em Biologia – Ramo Científico
pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial dos requisitos do grau de mestre em Engenharia Biomédica

Dissertação realizada sob a supervisão de
Doutora Maria Pia Ferraz
e co-supervisão de Professor Fernando Jorge Monteiro

Porto, Maio de 2006

Aos meus grandes amores,

meus Pais...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à todos aqueles que acreditaram que era possível continuar a caminhar, mesmo sabendo que as coisas nem sempre são como pensamos...

Ao Professor Fernando Jorge Monteiro, por me ter dado a oportunidade de estagiar no excelente grupo que coordena e à Maria Pia, por ter aceitado orientar o meu trabalho de mestrado.

Ao Professor Mário, pelo exemplo de trabalho e rigor que demonstrou ao longo deste tempo.

A todas as pessoas do Laboratório de Biomateriais, pela simpatia e disponibilidade com que me acolheram.

Ao Prof. Sérgio Simões, pela enorme amabilidade com que me recebeu em Coimbra.

Ao Henrique Faneca, à Isabel Lapa, à Cristina Fonseca e a Adriana por toda a ajuda que me deram durante a minha passagem por Coimbra.

A todos os professores e Irmãs do Colégio... pela compreensão, oração e substituições nos momentos de maior aperto...Um agradecimento especial à Sónia Cruz e à Patrícia Borlido pela infinita disponibilidade.

Aos meus amigos mais próximos, por nunca se terem esquecido que eu existia, apesar da minha ausência. Os meus agradecimentos aos “Bertinhos” Beta, Bruninho e Martinho, que tantas vezes me “quebraram o galho”, durante estes dois anos... à minha Claudinha e à Susanita, pela camaradagem de irmãs.

Aos meus Pais, pelos sacrifícios, pela paciência e pelo amor.

A todos aqueles a quem agradeço eternamente: Nuno Penacho, Ana Paula Pego, Hugo Oliveira, Carla Moreira, Liliana Pires, Luís Santos, Alis Pataquiva, Patrícia Cardoso, Marta Evangelista e Hugo Pinheiro; pelo tempo dedicado, pela forma alegre e entusiasta de transmitir os conhecimentos. Entre um café e uma risada estas pessoas primaram pela inqualificável paciência e disponibilidade, que tanto contribuíram para que este trabalho se realizasse. Muito obrigada a todos.

" Ao acreditarmos nas flores, fazemos por vezes com que elas nasçam."

(Sta. Teresa d'Ávila)

RESUMO

A reparação de fracturas e de defeitos no osso, são normalmente alvo da cirurgia ortopédica. Nas terapias convencionais de autoenxertos e aloenxertos são reconhecidas várias limitações, surgindo em alternativa, a utilização de biomateriais substitutos do osso. Todavia, estes ainda colocam alguns problemas, como a indução de reacções inflamatórias e limitadas propriedades biomecânicas. Assim, a modelação das vias biológicas responsáveis pela cura da fractura e osteogénese pode reduzir a incidência destas complicações aumentando a eficiência da osteogénese.

As BMP's (bone morphogenetic proteins) têm sido descritas como sendo efectivas na deposição do tecido ósseo. A terapia génica poderá ser um método alternativo para a libertação das BMP's nos tecidos e estimulação da osteogénese. Porém o desenvolvimento de vectores contiua a ser um dos grandes problemas em terapia génica, tanto do ponto de vista técnico como ético. Os lipossomas catiónicos, sendo vectores não virais e, dado suas particulares características, podem constituir um bom método para a libertação de genes em células do tecido ósseo, dado a sua versatilidade e segurança.

O objectivo deste trabalho foi, portanto, avaliar em que medida os lipossomas catiónicos constituem uma estratégia para a libertação de material genético em células do tecido ósseo. Os lipossomas foram preparados com DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol em várias razões de carga e caracterizados quanto ao tamanho, potencial zeta, capacidade de protecção do DNA e citotoxicidade. Foram também feitos estudos de transfecção em duas linhas de células osteoblásticas (MG-63 e MC3T3-E1) e na linha 293T, fazendo variar a razão de carga (lípido-catiónico/DNA) e dose de DNA aplicada. Para além disso, utilizou-se a transferrina como ligando a fim de aumentar os níveis de expressão do plasmídio utilizado (pCMVβ-gal).

Os resultados sugerem que existe uma elevada dependência entre a actividade de transfecção e as razões de carga dos complexos, formulação lipídica utilizada, dose de DNA aplicada e o tipo de células, verificando-se diferenças mesmo relativamente às duas linhas osteoblásticas em estudo. As células da linha MC3T3-E1 apresentam níveis de expressão mais elevados do que as células da linha MG-63. A utilização da transferrina associada aos complexos permite aumentar os níveis de transfecção, possivelmente devido a um aumento dos níveis de internalização dos complexos. Assim, a conjugação de transferrina ao vector lipídico parece ser uma boa estratégia para induzir a expressão de um determinado gene em células osteoblásticas. No entanto, o esclarecimento do mecanismo de acção dos vectores lipídicos, assim como das células em questão, revela-se importante para obtenção de níveis mais elevados de expressão.

ABSTRACT

The repair of fractures and bone defects is a common procedure in orthopaedic surgery. The conventional therapies, such as autografts and allografts, have some limitations, but alternatively one can use some biomaterials that replace the bone. However, these biomaterials still present some problems too: the increase of inflammatory reactions and poor biomechanical properties. So, the modulation of the biological pathways responsible for fracture repair and osteogenesis may accelerate regeneration and reduce the incidence of these complications.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) have been reported to be effective in enhancing bone deposition. Gene therapy may provide an alternative method for the release of the BMP proteins into tissues, stimulating osteogenesis. Nonetheless, the development of vectors for gene release is still a problem in terms of ethics and techniques. Cationic liposomes may present an effective method for the release of genes into bone tissue cells as non viral vectors, because of its specific characteristics, safety and versatility.

The goal of this thesis was to evaluate whether cationic liposomes constitute a valuable strategy for the release of genetic material into bone tissue cells. The liposomes have been prepared with DOTAP-DOPE and DOTAP-Colesterol and characterised according to their size, zeta potential, capacity of DNA protection and citotoxicity. Some studies have also been carried out concerning the transfection (with pCMVβ-gal plasmid) in two lines of osteoblastic cells (MG-63 and MC3T3-E1) and in the 293T line, varying the charge ratio and the DNA dose applied. Further, we have used the transferrin to increase the expression.

The results suggest that there is a great dependency between the transfection activity and the charge ratios of the complexes, the lipidic formulation that was used, the DNA dose that was applied and the type of cells. There were even some differences concerning both osteoblastic lines under study. The cells of the

MC3T3-E1 line present greater expression levels than the cells of the MG-63 line. The conjugation of the transferrin associated with the complexes contributes for the increase of the transfection levels, possibly due to an increase of internalisation of complexes. So, the conjugation of the liposomes with the transferrin seems to be a good strategy to induce the expression of specific gene in osteoblastic cells. However, the full understanding of the liposome transfection mechanism, as well as the correspondent underlying cellular mechanism are critical points to achieve enhanced transfection efficiency.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS iv

RESUMO vi

ABSTRACT viii

ÍNDICE x

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

LISTA DE ABREVIATURAS xv

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO 1

1. DO DNA À TERAPIA GÉNICA 1

2. VECTORES UTILIZADOS EM TERAPIA GÉNICA 4

2.1. Vectores Virais 4

2.2. Vectores Não Virais 6

3. CARACTERÍSTICAS DOS LIPOSSOMAS 8

4. NATUREZA DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS 10

5. FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS CATIÓNICOS LIPOSSOMA DNA (LIPOPLEXOS) 14

5.1. Método de preparação dos lipoplexos 15

5.2. Parâmetros que afectam as propriedades físico-químicas dos lipoplexos 17

6. INTERACÇÃO LIPOPLEXOS-CÉLULA 18

6.1. Entrada dos lipoplexos nas células 19

6.1.1. Complexos ternários: associação da transferrina 20

6.2. Libertação do DNA para o citoplasma 21
6.3. Acesso do DNA ao núcleo 22
7. REGENERAÇÃO DO OSSO 24
7.1 Pré-requisitos para a regeneração do osso 24
7.2. Engenharia de tecidos na reparação do osso 26
7.3. Terapia génica para a reparação do osso 28
7.4. Desafio: vectores não virais para terapia génica em osteoblastos 29

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS 31

1. LINHAS CELULARES MG-63, MC3T3-E1 E 293T 31
1.1. Cultura e Manutenção das linhas celulares MG-63, MC3T3-E1 e 293T 31
1.1.1. Descongelamento de células 31
1.1.2. Manutenção das células e subcultura 32
2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS 33
2.1. Preparação dos lipossomas por hidratação/extrusão 33
2.2. Quantificação do teor lipídico dos lipossomas 34
2.2.1. Método de Fiske e Subbarow 34
2.2.2. Quantificação do teor de colesterol dos lipossomas 35
3. ESTUDOS DE TRANSFECÇÃO 35
3.1. Preparação das células 35
3.1.1. Contagem das células pelo método do *Trypan Blue* 36
3.2. Amplificação e extracção do DNA plasmídico 36
3.3. Preparação dos complexos lipossomas catiónicos/DNA 37
3.4. Transfecção 38
3.5. Determinação da actividade da luciferase 38
3.6. Determinação da actividade da β-gal 39

3.6.1. Preparação da recta de calibração 40
3.7. Quantificação da proteína total 40
3.8. Marcação (Staining) para a actividade da β-gal 41
4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR 42
5. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PROTECÇÃO DO DNA CONFERIDO PELOS COMPLEXOS 42
6. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DOS COMPLEXOS 44
7. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS COMPLEXOS 45
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 45

CAPÍTULO III – RESULTADOS 46

1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS 46
1.1. Determinação do tamanho e do potencial zeta dos complexos 46
2. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PROTECÇÃO DO DNA CONFERIDA PELOS COMPLEXOS 50
3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR 53
4. INFLUÊNCIA DA DENSIDADE E CONFLUÊNCIA CELULAR 55
5. EFEITO DO TIPO DE LÍPIDO E DA RAZÃO DE CARGA (LÍPIDO/DNA) NA ACTIVIDADE DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63, MC3T3-E1 E 293T 56
6. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE DNA NA ACTIVIDADE DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63 E MC3T3-E1 64
7. EFEITO DO TIPO DE LÍPIDO E DA RAZÃO DE CARGA (LÍPIDO/DNA) NA EFICIÊNCIA DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63, MC3T3-E1 E 293T 67

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO 70

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO 77

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Dogma central da Biologia Molecular 2

Figura 2: Vectores utilizados em ensaios clínicos 4

Figura 3: Representação esquemática dos lipossomas 9

Figura 4: Estrutura de alguns lípidos catiónicos usados em terapia génica 10

Figura 5: Exemplo de estruturas comuns nos lípidos 11

Figura 6: Esquema da interacção entre lipossomas catiónicos e DNA 14

Figura 7: Representação esquemática da preparação dos lipossomas 16

Figura 8: Esquema do processo de transfecção mediada por lipoplexos 18

Figura 9: Representação esquemática das diferentes vias de endocitose 19

Figura 10: Representação esquemática da formação do osso 25

Figura 11: Valores de Potencial Zeta dos complexos 47

Figura 12: Variação do tamanho médio e do índice de polidispersão nos complexos preparados com DOTAP-DOPE 48

Figura 13: Variação do tamanho médio e do índice de polidispersão nos complexos preparados com DOTAP-Colesterol 50

Figura 14: Percentagem de DNA protegido calculada a partir do acesso do Brometo de Etídio ao DNA dos complexos 52

Figura 15: Percentagem de viabilidade celular na linha MG-63 53

Figura 16: Percentagem de viabilidade celular na linha MC3T3-E1 54

Figura 17: Percentagem de viabilidade celular na linha 293T 54

Figura 18: Influência da densidade/confluência celular na actividade de transfecção da linha celular MG-63 56

Figura 19: Efeito da razão de carga na actividade de transfecção e utilizando a formulação DOTAP-DOPE, em células MG-63 e MC3T3-E1 58

Figura 20: Efeito da razão de carga na actividade de utilizando a formulação DOTAP-Colesterol, em células MG-63 e MC3T3-E1 59

Figura 21: Efeito da composição lipídica e da razão de carga dos complexos na actividade de transfecção células MG-63 61

Figura 22: Efeito da composição lipídica e da razão de carga dos complexos na actividade de transfecção em células MC3T3-E1 62

Figura 23: Efeito da composição lipídica e da razão de carga dos complexos na actividade de transfecção em células 293T 63

Figura 24: Influência da quantidade de DNA na actividade de transfecção em células MG-63 65

Figura 25: Influência da quantidade de DNA na actividade de transfecção em células MC3T3-E1 66

Figura 26: Eficiência de transfecção nas células 293T 67

Figura 27: Eficiência de transfecção nas células MG-63 e MC3T3-E1 68

ABREVIATURAS

α-MEM	*Minimal essential medium – alpha medium*
AAV	Vírus adeno-associados
ATP	Adenosina trifosfato
BMP's	*Bone morphogenetic proteins*
BSA	Albumina sérica bovina
CO_2	Dióxido de carbono
DC-Chol	*Cholesteryl-3(beta)N-dimethyl aminoethyl*
DEAE	Dietilaminoetilo
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMRIE	Cloreto de N-(hidroxietil)-N-(2,3-ditetradeciloxipropanol) N,N-dimetilamonio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	*2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine*
DOTAP	*1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane,*
DOTMA	*2,34bis(oleoyl)propyl] trimethyl ammonium chloride*
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acetato de tetraetilenodiamina
EtBr	Brometo de Etídio
FBS	Soro fetal bovino
HBS	Hepes balanced saline buffer
LUV	*Large unilamellar vesicles*
MLV	*Multilamellar vesicles*
MTT	*DimetilTiazol-Tetrezolium*
MVL	*Multivesicular liposomes*
OLV	*Oligolamellar vesicles*
ONPG	*o-Nitrophenyl-beta-galactopyranoside*
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PEI	Polietilenimina
PEO	poli(óxido de etileno)

RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SUV	*Small unilamellar vesicles*
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
Tf	Transferrina
TGF-β	*Transforming growth factor*
URL	Unidades relativas de luz
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

INTRODUÇÃO

1. DO DNA À TERAPIA GÉNICA:

Desde o início dos tempos, o Homem tem incessantemente procurado o autoconhecimento. Inicialmente, os grandes filósofos tentavam identificar a relação do Homem com o Universo, mas os grandes passos foram dados no século XIX, quando Darwin reconheceu que o ser humano era resultado da evolução e, os estudos de Mendel foram publicados, formulando-se as leis da hereditariedade. No entanto, permanecia ainda desconhecido qual o mecanismo responsável pela hereditariedade. Em 1940 Oswald Avery e Colin MacLeod demonstram pela primeira vez que o DNA, e não qualquer outro material celular, constituía o material genético. Contudo, só uma década mais tarde, em 1953, é que Watson e Crick propõe uma estrutura para o DNA.

A molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma dupla hélice constituída por uma sequência de nucleotídeos. Cada um destes é formado por um açúcar (pentose), um grupo fosfato e uma base azotada. Os nucleotídeos estão unidos por ligações fosfodiéster. Estas pontes unem o carbono 3' da pentose de um nucleotídeo ao carbono 5' da pentose do nucleotídeo adjacente. As moléculas de açúcar e os grupos fosfato constituem o esqueleto do ácido nucleico, que apresenta uma carga exterior negativa, devido à presença dos grupos fosfato desprotonados a valores fisiológicos de pH (Robertis 1996)

Há três etapas fundamentais no fluxo da informação genética a partir do genoma: (1) replicação da molécula de DNA, e consequentemente, da informação genética; (2) transcrição dessa informação em moléculas de RNA; (3) tradução dessa informação e síntese de proteínas. Estes conceitos constituem o dogma central da biologia molecular.

Como é possível observar na figura 1, a transcrição pode ser inversa, isto é, o RNA pode sofrer replicação em alguns vírus e, através de uma enzima denominada transcriptase reversa, ser transcrito em DNA.

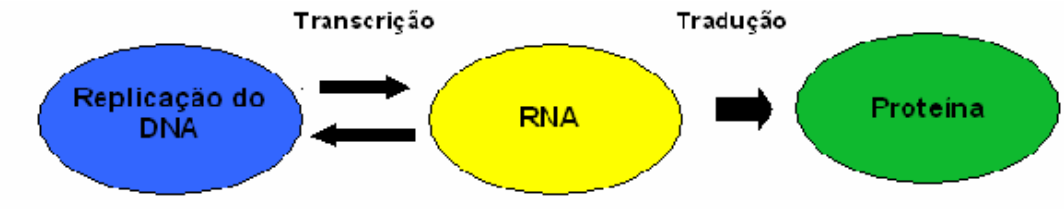


Figura 1– Dogma central da Biologia Molecular.

A partir daí, uma série de descobertas revolucionou o estudo da genética permitindo o aparecimento d*a genética molecular* ou *engenharia genética* - um conjunto de técnicas onde um determinado fragmento de DNA é isolado e os genes são purificados, examinados e manipulados. Estas descobertas levaram a tecnologia de clonagem, isto é, o isolamento de genes e/ou a sua reprodução em grande número em bactérias hospedeiras. Daí, foi um passo para a tecnologia de DNA recombinante dominar a ciência biológica e biomédica (Garcia and Chamas 1996).

A identificação dos genes responsáveis por características normais ou patológicas permitiu a aplicação dos princípios da medicina genómica, nomeadamente da terapia génica.

A terapia génica consiste na introdução de material genético no interior da célula, para que o produto da sua expressão possa curar ou retardar a progressão de uma determinada doença. Para Weatherall (Weatherall 1995), os procedimentos técnicos necessários à terapia génica em humanos são fáceis de enumerar (cinco passos), porém difíceis de alcançar. O primeiro passo consiste em isolar o gene e suas sequências reguladoras; o segundo, surge da necessidade de se obter em cultura uma quantidade suficiente de células retiradas do paciente, nas quais será inserido o gene terapêutico (no caso da terapia génica *ex-vivo*). O terceiro passo é dispor de um mecanismo eficiente (vectores) para inserir o gene nas células; o quarto, que o gene

inserido integre-se no genoma celular, se for esse o interesse, e funcione, isto é, que haja produto génico em quantidade suficiente e pelo tempo desejado; e o quinto, que todos estes procedimentos não apresentem efeitos colaterais indesejáveis.

O isolamento do gene e o seu teste em culturas de células não constituem grandes problemas de ordem técnica e/ou bioética para fins de tratamento de doenças. A tecnologia de DNA recombinante, desenvolvida em organismos simples, vem sendo, com sucesso, transposta para organismos complexos, inclusive o humano. O desenvolvimento de vectores, todavia, continua sendo um dos grandes problemas em terapia génica, tanto do ponto de vista técnico como ético. O gene isolado e replicado precisa de um vector que o transporte para dentro de células específicas do paciente, e que o active para desempenho exclusivo e adequado da função correctiva desejada.

2. VECTORES UTILIZADOS EM TERAPIA GÉNICA

Mais de 2000 pacientes em todo o mundo já foram submetidos a ensaios clínicos com terapia génica desde 1990, utilizando para o transporte de genes, vectores virais e não virais (Kikuchi, Suzuki et al. 1999).

Os diversos tipos de vectores são utilizados com o objectivo de transportar o DNA terapêutico ao núcleo das células-alvo. Um vector ideal seria aquele que pudesse acomodar um tamanho ilimitado de DNA, fosse disponível numa forma concentrada, pudesse ser facilmente produzido, ser direccionado para tipos específicos de células, garantisse uma expressão génica a longo prazo e fosse não-tóxico e não-imunogênico. Tal vector ainda não existe e nenhum dos sistemas de entrega de DNA actualmente disponíveis para transferência génica *in vivo* é perfeito com respeito a qualquer um desses pontos (Nardi, Teixeira et al. 2002). Os vectores utilizados actualmente podem ser divididos em dois grandes grupos: vectores virais e não virais.

2.1. VECTORES VIRAIS:

Os vectores virais incluem os retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados, lentivírus e vírus herpes simplex, possuindo características que permitem uma eficiente transferência de material genético, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Os retrovírus entram nas células através de interacções entre as glicoproteínas da sua cápsula e receptores da superfície celular. Uma vez internalizado, o RNA viral é transcrito em DNA, integrando-se no genoma da célula hospedeira. No entanto apenas podem infectar células com capacidade de divisão (Eliyahu, Barenholz et al. 2005).

Os lentivírus pertencem à família dos retrovírus, no entanto, contrariamente aos restantes retrovírus, possuem a capacidade de infectar células sem capacidade de divisão (Penque 2000).

Os adenovírus são capazes de infectar vários tipos de células, inclusive as que não se encontram em divisão, o que constitui uma grande vantagem para a libertação de genes *in vivo*. Não se integram no DNA hospedeiro, sendo rapidamente excluído das células em divisão. Apenas em células que não se dividem, estes vectores têm potencial de induzir a expressão transgénica permanente (Winn, Hu et al. 2000).

Os vírus adeno-associados (AAV) são estáveis, podem infectar células em divisão, ou não, e não estão associados a nenhuma doença humana havendo evidências que 60-80% dos adultos já estiveram expostos aos AAV (Winn, Hu et al. 2000). O vírus herpes simplex , ao contrário dos AVV, não se integram no genoma do hospedeiro. Mas são atractivos como vectores para transfecção de neurónios, pois algumas destas células retém estes vírus numa forma latente durante toda a vida do indivíduo afectado (Lima and Mota 2003)

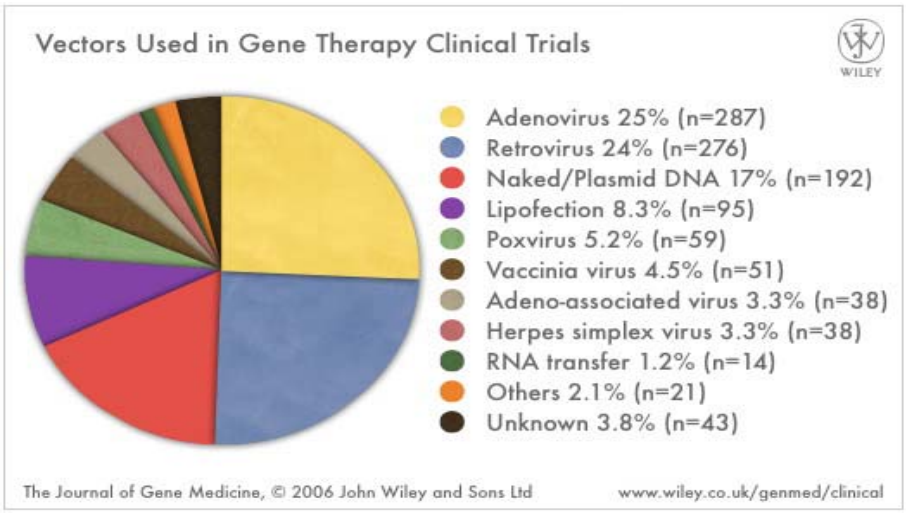


Figura 2: Vectores utilizados em ensaios clínicos. Retirado de “The journal of Gene Medicine”, 2006.

Muitos vírus têm vindo a ser explorados como vectores na terapia génica, uma vez que, possuem uma capacidade natural para invadir as células e expressar suas proteínas. Cerca de 70% dos recentes ensaios clínicos envolvendo terapia génica, utilizam vectores virais (figura 2), pois permitem elevados níveis de transfecção e rápida transcrição do material inserido no genoma viral.

No entanto, o seu uso é limitado por vários factores. A segurança tem sido um assunto fortemente discutido, depois da morte de uma paciente durante um ensaio clínico que investigava o potencial da terapia génica utilizando vectores virais. Mas mais limitações se colocam: a presença de resposta imunitária e inflamatória contra o sistema de transfecção, limitação no tamanho do plasmídeo a incorporar, possibilidade de recombinação e dificuldade na sua produção em grande escala. (Kikuchi, Suzuki et al. 1999).

2.2. VECTORES NÃO VIRAIS:

Os sistemas não virais são uma alternativa na transferência génica, pois ao contrário dos vírus, apresentam baixa ou nula toxicidade, são facilmente manipuláveis e menos dispendiosos. Todavia, apresentam uma baixa eficiência na transfecção e expressão transiente, apesar de em alguns casos, esta expressão poder ser usada no tratamento de doenças crónicas ou agudas, por administrações repetidas (Tseng and Huang 1998).

O sistema não viral mais simples utiliza DNA livre, ou a sua injecção directa em células ou tecidos. A aplicação é simples, no entanto, só um pequeno número de células são transfectadas, sendo a taxa de degradação elevada. A aplicação de sistemas de pulsos eléctricos alternados à células que estão em contacto com uma solução contendo DNA é designada electroporação. Gera-se uma corrente capaz de formar poros na membrana celular, facilitando a entrada do material genético nas células. Outro método utilizado, principalmente no desenvolvimento de vacinas é a biobalística, onde microsferas de metal são cobertas com DNA, aceleradas e projectadas contra as células, promovendo a

entrada do DNA no núcleo das células alvo (Penque 2000; Eliyahu, Barenholz et al. 2005).

Os métodos químicos são uma alternativa dentro dos vectores não virais baseando-se na formação de um complexo entre as cargas positivas existentes em polímeros ou lípidos catiónicos, e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA. Desde o aparecimento dos primeiros métodos químicos, no final de 1950, uma grande variedade de compostos com a mesma finalidade surgiram (Luo and Saltzman 2000). Os polímeros catiónicos podem ser especificamente construídos para uma determinada aplicação, modificando-se o peso molecular, adicionando grupo de ligação específica a determinadas células e tecidos, ou, levando a cabo qualquer outra modificação de modo a obter-se as propriedades físico-químicas pretendidas. A polietilenimina (PEI), a poli-L-lisina, dendrímeros, o fosfato de cálcio e o dextrano-dietilaminoetilo (dextran-DEAE) são largamente utilizados como vectores, embora o dextran-DEAE e o fosfato de cálcio só sejam utilizados em transfecções *in vitro,* devido à elevada toxicidade *in vivo* (Eliyahu, Barenholz et al. 2005). Entre os vectores não virais, os lipossomas catiónicos são os mais utilizados, tendo como vantagens a simplicidade de preparação e segurança de utilização em seres humanos, podendo transportar material genético de grande tamanho (Tseng and Huang 1998). A sua superfície é facilmente modificável com açúcares ou compostos hidrofílicos a fim de alcançar células ou tecidos específicos, tendo, mesmo assim, um menor custo de produção que os vectores virais (Kikuchi, Suzuki et al. 1999).

3. CARACTERÍSTICAS DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas nas quais um pequeno volume aquoso é encapsulado numa bicamada lipídica. O tamanho destas vesículas varia entre um mínimo teórico de 25 nm de diâmetro até vários micrómetros (Monkkonen and Urtti 1998).

Os lipossomas têm propriedades únicas que os tornam sistemas de incorporação e transporte apropriados tanto para substâncias solúveis em água, como em solventes orgânicos: as substâncias hidrófilas são incorporadas no espaço interno aquoso dos lipossomas e as hidrófobas na bicamada lipídica. Com pequenas excepções, pode dizer-se que é possível incorporar em lipossomas praticamente qualquer tipo de substância, independente do seu peso molecular, carga eléctrica e solubilidade (Lima and Mota 2003). A capacidade de transfecção deste sistema deve-se à certas propriedades como: (1) Interacção electrostática espontânea entre as cargas positivas dos lipossomas e as cargas negativas do DNA, o que resulta numa eficiente condensação dos ácidos nucleicos; (2) O complexo resultante da ligação entre os lipossomas catiónicos e o DNA pode ter carga positiva, promovendo sua associação com a membrana celular carregada negativamente; (3) As propriedades fusogénicas por algumas formulações de lipossomas catiónicos podem induzir a fusão e/ou a destabilização da membrana plasmática, facilitando a libertação intracelular do DNA complexado (Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001).

Tendo em conta o seu tamanho, os lipossomas podem ser considerados vesículas pequenas (50-80 nm), grandes (80-1000nm) ou gigantes (1-50μm). São ainda definidos de acordo com o número de bicamadas lipídicas ou "lamelas" em unilamelares, oligolamelares (2-10 bicamadas), e multilamelares (Lasic and Templeton 1996). Baseado no seu número de bicamadas lipídicas e tamanho, (nomenclatura adoptada a partir dos anos 80), os lipossomas são classificados em SUV ("small unilamellar vesicles") , LUV ("large unilamellar vesicles"), OLV ("oligolamellar vesicles"), MLV ("multilamellar

vesicles") e MVL ("multivesicular liposomes") (fig.3) (Santos and Castanho 2002).

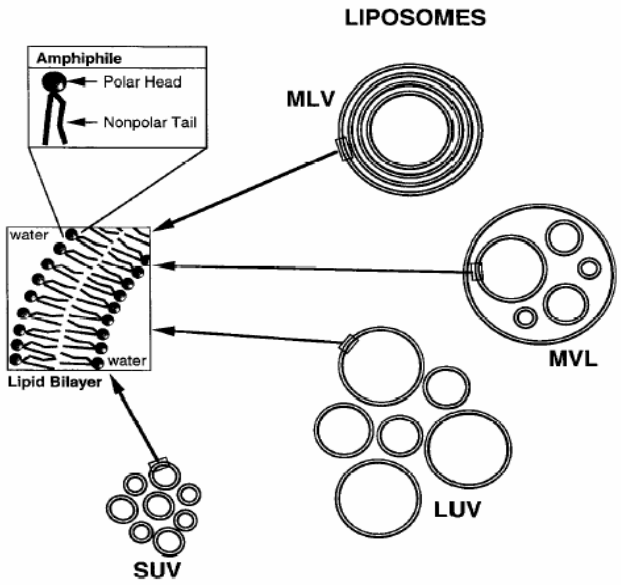


Figura 3 – Representação esquemática dos lipossomas. SUV – "small unilamellar vesicles"; LUV – "large unilamellar vesicles"; OLV "oligolamellar vesicles"; MLV "multilamellar vesicles" e MVL "multivesicular liposomes". Retirado de Lasic e Templeton, 1996.

4. NATUREZA DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

Os lipossomas catiónicos são constituídos principalmente, por misturas binárias entre um lípido catiónico e um composto neutro (co-lípido).

Os lípidos catiónicos são compostos por uma extremidade catiónica (iões ternários ou quaternários de amónia, guanidina, etc.), um "linker" e uma parte hidrofóbica (Tranchant, Thompson et al. 2004). Nos últimos anos têm sido levados a cabo muitos trabalhos para o desenvolvimento de novos lípidos catiónicos com menor toxicidade e diferente capacidade para mediar a entrega de genes (figura 4).

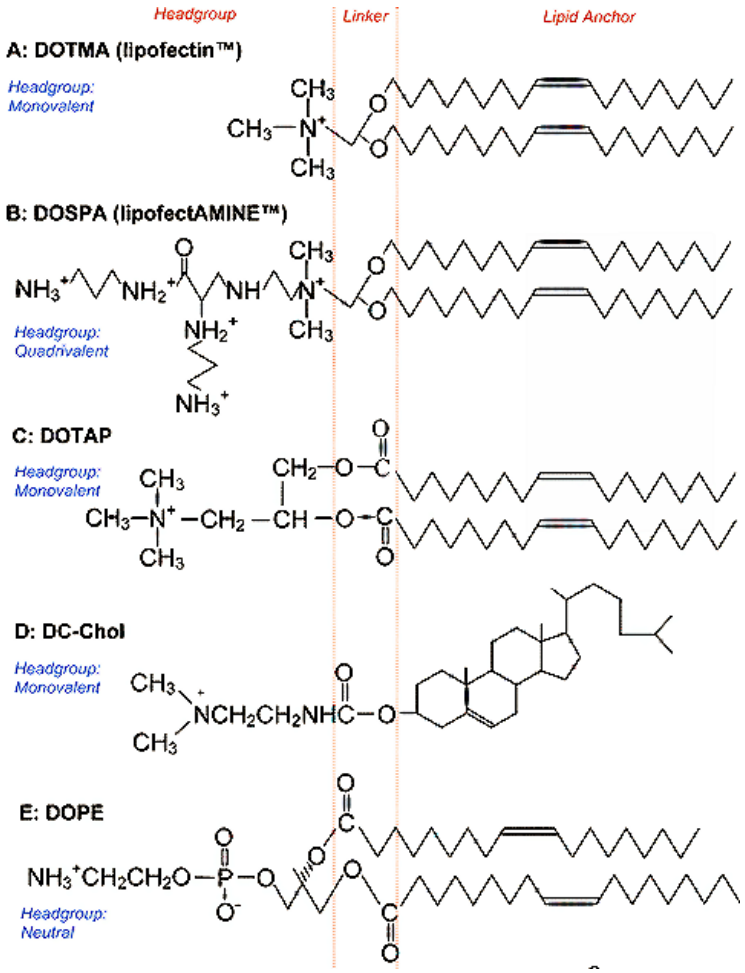


Figura 4– Estrutura de alguns lípidos catiónicos usados em terapia génica. Adaptado de http://www.physics.helsinki.fi

Trabalhos desenvolvidos no início dos anos 90 mostraram que a natureza do lípido catiónico, isto é, comprimento e saturação das cadeias de ácidos gordos, natureza das ligações químicas entre as várias partes da molécula, o comprimento do espaço entre a parte com carga e a parte hidrofóbica, natureza da carga e valores de p*K,* densidade de cargas e número de cargas por molécula, hidroxilações, metilações, etc., da parte polar podem influenciar a eficácia da transfecção (Lasic and Templeton 1996).

Quanto à parte hidrofóbica, esta é composta por duas cadeias de hidrocarbonetos ou o colesterol. As cadeias de hidrocarbonetos são lineares, podendo ser saturadas ou mono-insaturadas. Existem diferentes pontos de vista quanto ao grau de saturação e ao tamanho ideal das cadeias. No entanto, geralmente, a actividade de transfecção dos lípidos catiónicos aumenta com a diminuição do comprimento e grau de saturação das cadeias alquil ou acil (Zuhorn and Hoekstra 2002). O colesterol oferece maior rigidez à bicamada lipídica. (Carriere, Tranchant et al. 2002).

Os lípidos representam um estado líquido-cristalino da matéria exibindo caracteristicamente, diferentes fases conectadas por fases de transição (figura 5). As diferenças a nível molecular na composição dos lípidos, reflectem-se na temperatura de transição de fase dos lípidos catiónicos, implicando assim uma alteração na fluidez da membrana. No entanto, a fluidez do lípido, por si só, não basta para prever a fluidez do complexo lípido catiónico-DNA (Zuhorn and Hoekstra
2002).

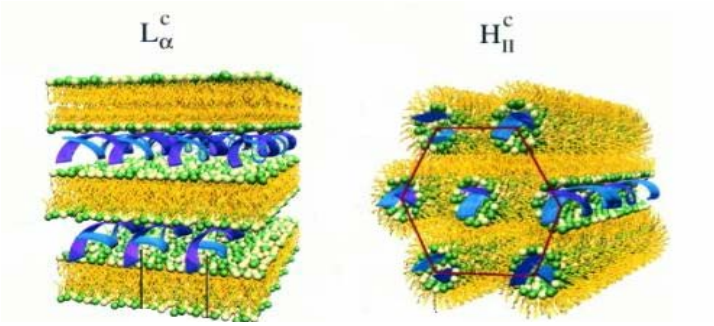


Figura 5 - Exemplo de duas estruturas comuns nos lípidos. A – lamelar; B – Hexagonal. As hélices de DNA estão representadas a azul. Adaptado de http://dequim.ist.utl.pt/CQFM/BiolFluor

Estas mudanças de fase são provocadas também por factores tais como temperatura, iões, campos eléctricos e pH, causando profundas alterações nas propriedades físico-químicas e funcionais dos sistemas (Kinnunen, Alakoskela et al. 2003)

Foi demonstrada também uma correlação directa entre a natureza do grupo de ligação dos lípidos catiónicos e o seu potencial citotóxico. Lípidos com ligações éter (ex. DOTMA, DMRIE) são mais tóxicos do que os que contém ligações éster (ex. DOTAP) (Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001)

No que diz respeito à parte catiónica, os grupos multivalentes apresentam maior capacidade de condensação e protecção do DNA, comparativamente com os lípidos monovalentes. No entanto essa ligação muito forte que se estabelece entre o lípido e o DNA pode dificultar a sua posterior dissociação (Radwan Almofti, Harashima et al. 2003).

A importância da associação de um co-lípido para o aumento da capacidade dos lipossomas catiónicos transfectarem as células, tem sido demostrada em vários trabalhos (Zuidam and Barenholz 1998; Girao da Cruz, Simoes et al. 2001; Tranchant, Thompson et al. 2004).

O DOPE (dioleoifosfatidiletanolamina) é um co-lípido com fórmula química $C_{41}H_{78}NO_8P$. Estudos *in vitro* demonstram claramente que, lipossomas constituídos por uma mistura equimolar de DOPE e um lípido catiónico, apresentam níveis mais elevados de transfecção em comparação com a utilização de outros co-lípidos (Hirsch-Lerner and Barenholz 1999). Este facto deve-se à capacidade que o DOPE tem de facilitar a formação de lipossomas em conjunto com os lípidos catiónicos e, à sua tendência a sofrer uma passagem, sob pH ácido, de uma configuração de bicamada à hexagonal, o que facilita a fusão e/ou a destabilização das membranas alvo, particularmente do endossoma (Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001). A coexistência de lipossomas nas duas fases, lamelar e hexagonal, também é uma vantagem na utilização do DOPE como co-lípido(Hirsch-Lerner, Zhang et al. 2005). Foi também sugerido que DOPE pode ter um papel importante na desintegração do complexo lípido-DNA depois da sua internalização, facilitando a libertação

do DNA dos endossomas. Isso foi baseado na suposição de que o grupo amina do DOPE poderia interagir com os grupos fosfato do DNA levando ao enfraquecimento das pontes entre o DNA e o lípido catiónico (Harvie, Wong et al. 1998).

O colesterol também é utilizado como co-lípido, resultando na maioria das vezes, em complexos mais estáveis do que no caso do DOPE. Ao contrário do que acontece nos estudos *in vitro,* a utilização do colesterol como co-lípido nos estudos *in vivo*, resulta numa maior taxa de transfecção, uma vez que permite aumentar a concentração de lípido e DNA sem afectar a estabilidade dos complexos (Simões, Filipe et al. 2005). Assim sendo, apesar dos benefícios demonstrados empiricamente na utilização do DOPE como co-lípido, a escolha deste deve ter como base a estrutura e actividade pretendida para o complexo lipossoma catiónico-DNA.

De acordo com Felgner, elevadas concentrações de lípidos podem ser tóxicas. No entanto a toxicidade depende do tipo de células, tempo de incubação com as células, densidade celular e a presença de soro (Duzgunes, Simões et al. 2001).

5. FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS CATIÓNICOS LIPOSSOMA-DNA

É do consenso geral que o modo de formação dos lipoplexos determina em grande parte as suas características físico-químicas e, consequentemente, modela a sua actividade biológica. Ao longo dos anos, diversos modelos foram propostos para explicar a formação dos complexos lípidos catiónicos-DNA.

Inicialmente foi proposto que os lipoplexos eram o resultado da ligação entre quatro lipossomas catiónicos ao plasmídio, por interacções electrostáticas. Gershon e colaboradores, com observações de microscópio electrónico, propuseram um modelo diferente no qual em uma razão de carga baixa lípido-DNA (+/-), os lipossomas são adsorvidos na superfície das moléculas de DNA formando agregados que progressivamente vão rodeando as moléculas de DNA. A adição contínua de lipossomas até uma concentração e densidade crítica, resulta numa fusão entre lipossoma e DNA, levando ao colapso e condensação deste último (figura 6) (Gershon, Ghirlando et al. 1993).

Recentemente, estudos combinando microscopia óptica e a difracção de Raios X revelaram que a mistura de lipossomas catiónicos e DNA resulta na transição da estrutura lipossomal para monocamadas de DNA, encaixadas entre bicamadas de lípidos catiónicos (Kinnunen, Alakoskela et al. 2003).

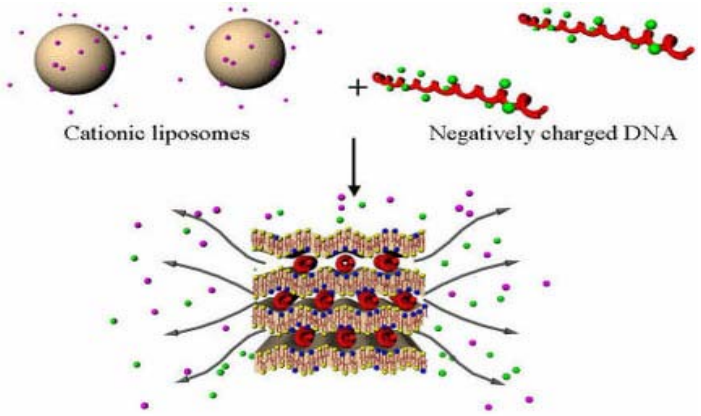


Figura 6– Esquema ilustrativo da interacção entre lipossomas catiónicos e DNA. Adaptado de Parsegian 2005

No entanto, coexistem uma série de estruturas propostas para os lipoplexos. Actualmente a estrutura mais aceite é a de “fingerprint”, que é definida por sucessões alternadas de bicamada lipídica e moléculas de DNA (figura 6). No entanto, cada autor defende a sua teoria provavelmente porque lipoplexos preparados com lípidos diferentes apresentam estrutura diferentes (Simberg, Daninos et al. 2001).

5.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS

O tipo de lipossoma é essencialmente condicionado pelo seu método de preparação, devendo este, ser escolhido criteriosamente.

Desde a publicação dos primeiros artigos descrevendo a preparação e caracterização de lipossomas multilamelares, vários métodos têm sido desenvolvidos afim de criar lipossomas com diferentes tamanhos e características. Dentre estes métodos pode citar-se a preparação por injecção etanólica, liofilização (A. and Winden 2003), o método de preparação por remoção do detergente (Schubert 2003), por evaporação de fase reversa (Duzgunes 2003) ou utilizando homogeneizadores de alta pressão (Rodriguez and Xamani 2003).

Em escala laboratorial, as MLV, SUV e LUV são as vesículas lipídicas mais utilizadas. A preparação destes três tipos de suspensão lipídica é descrito sumariamente na figura 7. De um modo geral, a preparação dos lipossomas pode ser dividida em três fases consecutivas: preparação da fase aquosa e lipídica seguida de evaporação do solvente, hidratação do lípido e ainda, para a maioria dos sistemas, um processamento secundário, necessário para a obtenção do produto final (Santos and Castanho 2002). No método de preparação por hidratação/extrusão, após a escolha da composição lipídica e do solvente a utilizar, os volumes adequados são misturados e o solvente orgânico é evaporado até a secura, sob fluxo de azoto, de modo a formar um filme lipídico tão fino quanto possível. A hidratação do filme é feita adicionando ao balão contendo o filme, o volume desejado de solução aquosa escolhida,

agitando-se suavemente. No fim desta etapa, dispõe-se já de uma suspensão de MLV.

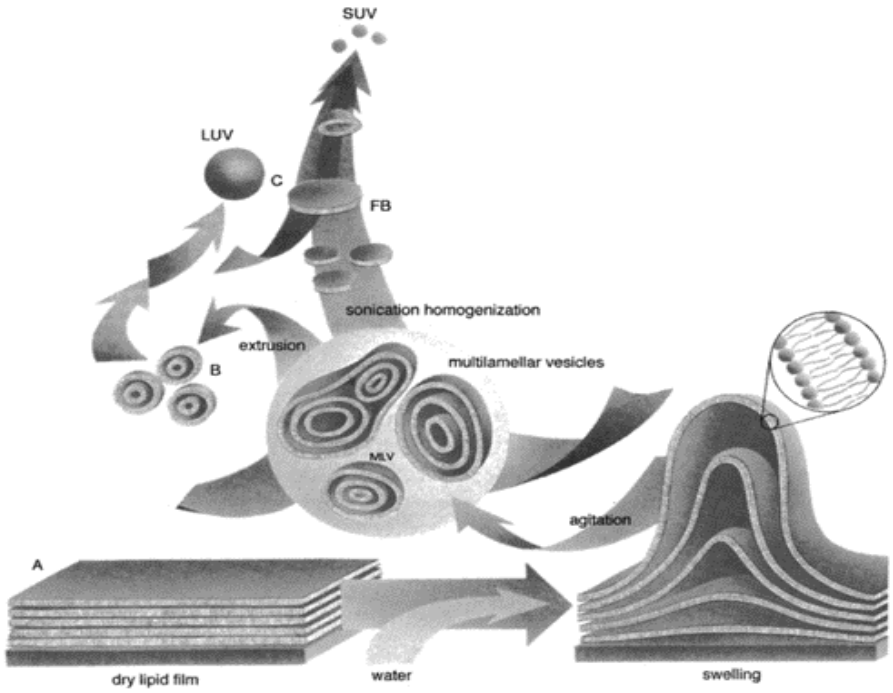


Figura 7 - Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes LUV). Adaptado de www.avantilipids.com.

A partir daqui, várias alterações podem ser introduzidas nos protocolos de preparação dos lipossomas de modo a obter-se o tamanho de vesículas pretendido, com as características desejadas. Contudo, para a obtenção de SUV, apenas é necessário submeter as MLV obtidas, a sonicação seguida de ciclos de extrusão, através de membranas de policarbonato com o poro pretendido, utilizando para o efeito um extrusor. Este método tem a vantagem de ser rápido e requerer um equipamento de baixo custo (Mui, Chow et al. 2003)

5.2. PARÂMETROS QUE AFECTAM AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOPLEXOS

Apesar do crescimento da investigação sobre os factores bioquímicos e biofísicos envolvidos na transferência de genes por lipossomas catiónicos, tais como características estruturais, associação celular e transporte intracelular, as relações existentes entre esses mecanismos de intenalização dos lipoplexos pelas células não estão inteiramente compreendidas (Radwan Almofti, Harashima et al. 2003).

Para além dos factores cinéticos e termodinâmicos que afectam a formação dos lipoplexos, existem outras propriedades importantes para o sucesso da transfecção tais como morfologia, tamanho, densidade de carga e estabilidade coloidal. A concentração de lípido catiónico e DNA, a força iónica e temperatura do meio de suspensão, a ordem de adição dos compostos, bem como o grau de mistura e o tempo de formação dos complexos representam parâmetros críticos (Lasic and Templeton 1996; Koe, Way et al. 1997; Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001).

A proporção relativa de lípido catiónico e DNA determinam em grande parte o tamanho, a carga superficial (potencial zeta), a eficácia de complexação, estabilidade coloidal e actividade biológica dos complexos. Complexos preparados com uma razão de carga lípido-DNA (molar) de 1/1 exibem potencial zeta que ronda a neutralidade. Tais complexos possuem uma distribuição heterogénea de tamanho e menor estabilidade coloidal do que aqueles que são preparados com excesso de cargas positivas ou negativas. Este facto pode ser atribuído à falta de forças electrostáticas repulsivas entre os complexos, que facilitam a sua agregação (Koe, Way et al. 1997; Zuidam and Barenholz 1998; Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001). Todavia, a influência da estequiometria lípido-DNA é muito difícil de avaliar, uma vez que para uma mesma razão de lípido-DNA, aumentando a concentração destes, há uma mudança significativa no tamanho e na estabilidade coloidal dos complexos, que pode resultar na precipitação dos lipoplexos (Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001)

6. INTERACÇÃO LIPOPLEXOS-CÉLULA

Apesar do uso extensivo dos lipossomas catiónicos para libertação de genes tanto *in vivo* como *in vitro,* os mecanismos pelos quais o DNA é libertado nas células ainda não está completamente compreendido. Vários obstáculos, incluindo a membrana citoplasmática, endossomal e nuclear, são reconhecidos na transfecção mediada por lipossomas. A maior desvantagem dos lipoplexos como transportadores de genes é a sua baixa eficiência de transfecção comparada com os vectores virais. Isso acontece devido ao baixo tempo de vida dos complexos, assim como sua inactivação por proteínas do soro e a sua toxicidade em elevadas concentrações (Zhdanov, Podobed et al. 2002).

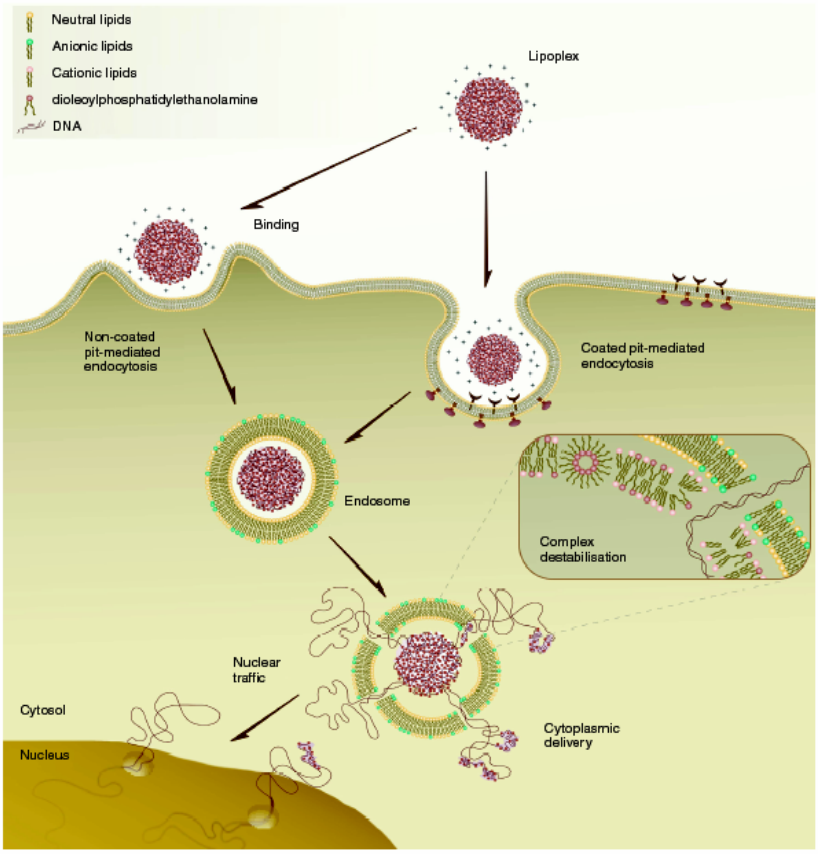


Figura 8 – Esquema representativo do processo de transfecção mediada por complexos de lipossomas catiónicos-DNA. Retirado de Simões, 2001.

De uma maneira geral (figura 8), os lipoplexos ligam-se à membrana citoplasmática da célula, devido à sua carga global positiva, sendo internalizados por endocitose (Simões, Filipe et al. 2005). Como resultado, forma-se uma vesícula revestida por uma membrana dupla, o endossoma. Durante a maturação do endossoma, a parede endossomal pode romper-se, libertando o DNA para o citoplasma. O DNA que alcança o núcleo poderá ser expresso. Alternativamente, o DNA pode continuar na via endocítica, acabando por ser degradado no interior dos lisossomas (Alan L. Parker, Christopher Newman et al. 2003).

6.1. ENTRADA DOS COMPLEXOS NAS CÉLULAS

Os complexos lípido-DNA podem ser internalizados nas células por dois processos: através da fusão directa com a membrana celular ou por endocitose (Zabner 1997; Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001). Estas duas vias não são exclusivas e podem ocorrer a várias extensões dependendo do tipo, confluência e idade das células, bem como do tamanho e carga dos lipoplexos. A maioria dos estudos realizados indica que a internalização dos lipoplexos é feita maioritariamente por endocitose (Duzgunes and Nir 1999; Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001; Radwan Almofti, Harashima et al. 2003). A endocitose pode ocorrer através de vários mecanismos englobados normalmente em duas categorias: fagocitose e pinocitose. Esta última compreende macropinocitose, via caveolae, via da clatrina e endocitose independente da via clatrina e da via caveolae (figura 9) (Conner and Schmid 2003)

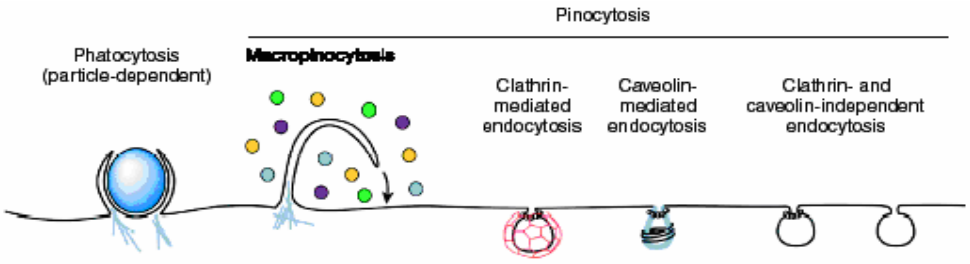


Figura 9 – Representação esquemática das diferentes vias de endocitose. Adaptado Conner and Schmid 2003.

De acordo com Rejman, na ausência de ligandos, o tamanho das partículas define a via de internalização e o consequente processo intracelular. Partículas menores que 200 nm são internalizadas pela via endocítica mediada por clatrina, alcançando rapidamente o compartimento lisossomal. As partículas entre 200 nm e 1 μm são preferencialmente internalizadas pela via caveolae. A cinética lenta desta via poderá facilitar a libertação do DNA no citoplasma, antes de alcançarem os lisossomas, diminuindo assim, a degradação. Isto poderá explicar a maior eficiência de transfecção observada para os complexos de maiores dimensões (Rejman, Bragonzi et al. 2005; Simões, Filipe et al. 2005)

Baseado nestas evidências, têm sido feitas tentativas afim de melhorar a internalização dos lipolexos pelas células utilizando sistemas de lípidos catiónicos direccionados para células específicas. Estes são obtidos através da associação de ligandos (proteínas ou péptidos) ou anticorpos direccionados a receptores mediadores da endocitose. Por exemplo, a associação de transferrina aos lipoplexos aumenta a transfecção numa grande variedade de células (Tros de Ilarduya, Arangoa et al. 2002; Simoes, Pires et al. 2003).

Apesar da interacção dos lipoplexos com as células representarem um evento importante, não existe correlação entre a ligação dos complexos à membrana e a eficiência de transfecção (Pires, Simoes et al. 1999; Zuhorn and Hoekstra 2002)

6.1.1. COMPLEXOS TERNÁRIOS: ASSOCIAÇÃO DE TRANSFERRINA

A transferrina complexada aos lipoplexos aumenta a actividade de transfecção uma vez que pode promover a internalização dos complexos nas células por endocitose mediada por receptores. Diferentes abordagens têm sido utilizadas para tentar compreender a interacção entre as células e os lipoplexos associados à transferrina, através de estudos de inibição competitiva e específica, e, pré-tratamento com drogas que interferem com a via da endocitose.

Devido às interacções electrostáticas, a transferrina e o DNA associam-se aos lipossomas catiónicos, levando à formação de complexos ternários, por um mecanismo ainda desconhecido. Possivelmente, os complexos são interiorizados quer por receptores mediados por endocitose, quer por fagocitose, dependendo do tamanho. Uma distribuição eficaz do DNA no citoplasma está dependente da acidificação do lúmen do endossoma. Esta acidificação leva a uma cascata de efeitos sinergéticos que provocam a dissociação do DNA dos complexos ternários e a destabilização da membrana do endossoma. As mudanças estruturais induzidas pela protonoção da apotransferrina podem promover a dissociação do complexo (Tros de Ilarduya, Arangoa et al. 2002; Simoes, Pires et al. 2003).

Também é possível que a apotransferrina se torne fusogénica, promovendo destabilização da membrana do endossoma criando assim condições favoráveis para o flip-flop dos lípidos aniónicos da camada interna da membrana do endossoma. As interacções electrostáticas entre os lípidos aniónicos presentes na camada interna da membrana do endossoma e os lípidos catiónicos, promovem a desagregação dos complexos e também auxiliam o DOPE na transição de bicamada à hexagonal invertida, adquirindo propriedades fusogénicas. Todos estes eventos levam à dissociação do DNA dos complexos e ao seu "escape" para o citoplasma (Simoes, Pires et al. 2003).

6.2. LIBERTAÇÃO DO DNA PARA O CITOPLASMA

A libertação do material genético no citoplasma é um passo crucial afim de evitar-se a degradação do DNA a nível dos lisossomas. De que forma os lipoplexos induzem a destruição do endossoma para ter acesso ao citoplasma é uma questão que ainda está por responder. No entanto, foi proposto que a destabilização da membrana endossomal pelos complexos internalizados é originada por um "flip-flop" dos lípidos aniónicos da camada exterior do endossoma para a camada interior, voltada para o lúmen. A formação de um

par de iões com carga neutra resulta na deslocação do DNA desse complexo, tendo os lípidos catiónicos um papel principal na libertação do DNA no citoplasma (Bally, Harvie et al. 1999; Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001; Simões, Filipe et al. 2005)

A este nível, o lípido neutro DOPE, tem um importante papel: promove a fusão do complexo com a membrana endossomal sob condições ácidas, permitindo assim, a libertação do DNA no citoplasma. Além disso, DOPE, também auxilia a dissociação do DNA dos lipoplexos devido à capacidade dos seus grupos amina competirem com os lípidos catiónicos pelos grupos fosfato presentes no DNA (Bally, Harvie et al. 1999).

É reconhecido no entanto, que em alguns casos, a dissociação do DNA só tem lugar no núcleo (Eliyahu, Barenholz et al. 2005).

6.3. ACESSO DO DNA AO NÚCLEO

Uma vez no citoplasma, o DNA tem que ultrapassar a membrana nuclear para que a transcrição ocorra. Também neste caso o conhecimento sobre o transporte do DNA para o núcleo ainda é escasso. Em linhas celulares que se dividem rapidamente, a entrada do DNA no núcleo é facilitada, uma vez que durante a mitose há desorganização da membrana. Na ausência de divisão celular, ainda não está clarificado se o DNA penetra a membrana nuclear através de poros por um processo de difusão passiva, ou através de um mecanismo envolvendo transporte activo. O primeiro modo de entrada é pouco provável de ocorrer uma vez que os poros actuam de forma selectiva evitando a livre troca de macromoléculas maiores que 70 kDa, o qual é significantemente menor que o peso molecular do DNA. O DNA pode ser importado para o núcleo activamente, por associação com proteínas específicas ou aos seus receptores, localizados no núcleo. Outra questão pertinente está relacionada com o grau de condensação/compacção do DNA quando ele atinge o núcleo. Neste estádio parece que uma cobertura parcial do DNA com lípidos poderia ser vantajoso, não só por reduzir o tamanho do

plasmídio, mas também por aumentar sua protecção contra as nucleases do citoplasma. Além disso, esses fragmentos de lípidos catiónicos associados ao DNA podem ter um papel na desorganização da membrana nuclear (Pedroso de Lima, Simoes et al. 2001; Simões, Filipe et al. 2005). No entanto, Zabner *et al* defendem que essa cobertura poderá inibir a transcrição (Zabner 1997).

7. REGENERAÇÃO DO OSSO

As fracturas e todos os demais problemas associados ao osso, como tumores e perda de massa óssea devido à osteporose afectam milhões de pacientes em todo o mundo (Baylink, Strong et al. 1999; Tsuda, Wada et al. 2003).

As Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde declararam a década de 2000-2010 como a de "Década dos Ossos e Articulações", a fim de promover interesse público de doenças ósseas e musculoesqueléticas. (Luo, Sun et al. 2005) .

7.1. PRÉ-REQUISITOS PARA A REGENERAÇÃO DO OSSO

O osso é um dos poucos órgãos com capacidade de regeneração na vida adulta, e o único tecido que pode continuar a sua remodelação ao longo da vida. Os mecanismos moleculares subjacentes à formação do osso são um processo complexo e altamente coordenado (figura 10). Durante a formação do esqueleto a formação do osso pode ocorrer através de duas vias: ossificação intermembranosa ou ossificação endocondral. No primeiro caso, a osteogénese ocorre directamente a partir de células estaminais. Na ossificação endocondral, as células estaminais formam cartilagem, prefigurando os futuros elementos do esqueleto, sendo o osso posteriormente substituído por cartilagem. A regeneração do osso depois de uma fractura processa-se em fases semelhantes à ossificação endocondral, começando com quimiotaxia e mitose das células estaminais. Apesar dos eventos moleculares subjacentes à regeneração do osso permanecerem indefinidos, é de consenso geral que a osteogénese é uma sequência de acontecimentos em cascata que recapitulam na sua maior parte os eventos ocorridos durante o desenvolvimento embrionário do esqueleto.

Apesar da capacidade de regeneração do osso, o tratamento de fracturas de maiores dimensões, perda de massa óssea devido a trauma, extracção de tumores ou osteoporose continua a ser um grande desafio na área da cirurgia ortopédica (Laurencin, Attawia et al. 2001). Os tratamentos existentes incluem o autoenxerto, aloenxerto e o implante de materiais sintéticos.

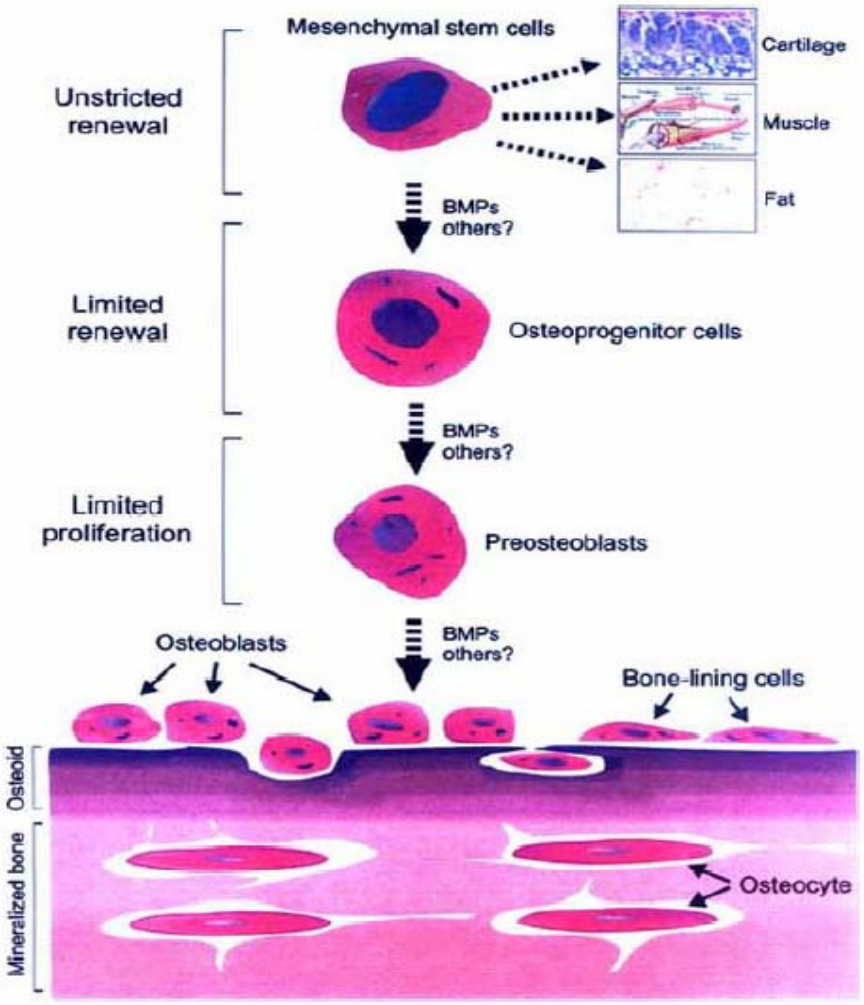


Figura 10 - Representação esquemática da formação do osso. Adaptado de Leach and Mooney 2004.

O autoenxerto do osso, apesar de ser considerado por muitos o melhor tratamento no presente, inclui uma série de problemas relacionados com uma possível morbilidade do dador e disponibilidade limitada de tecido .

O aloenxerto a partir de “bancos de osso”, apresentam ainda mais problemas associados com o risco de transferência de doenças e respostas imunitárias, para além de apresentarem reduzida capacidade osteogénica e custos elevados.

Os materiais sintéticos, substitutos do osso baseiam-se em cerâmicos ou metais. Os biocerâmicos são usados no tratamento dos defeitos do osso devido à sua osteoconductividade, o qual promove a regeneração do osso na proximidade do material. São deles exemplo, a hidroxiapatite e o TCP (tricalcio fosfato). Os metais incluem o titânio e suas ligas e o aço inoxidável, sendo utilizados para implantes dentais e reposição de articulações (Katz 1996). Estes materiais apresentam no entanto, propriedade biomecânicas muito diferentes do tecido ósseo humano, levando muitas vezes ao insucesso e à necessidade de correcção da cirurgia. A estabilidade dos implantes diminui com o tempo, não satisfazendo as exigências da população ainda na vida activa (Laurencin, Attawia et al. 2001). Devido às limitações existentes, a engenharia de tecidos do osso surgiu como uma alternativa para a reparação e regeneração óssea.

7.2. ENGENHARIA DE TECIDOS NA REPARAÇÃO DO OSSO

A abordagem clássica da engenharia de tecidos tem em conta três elementos: as células progenitoras ou estaminais, uma matriz que forneça um suporte tridimensional para osteocondução e os factores de crescimento osteoinductivos, isto é, factores que induzam as células progenitoras à diferenciação em osteoblastos. Nesta abordagem inclui-se o potencial de modificar as células geneticamente de modo a que expressem os factores de crescimento necessários (Partridge and Oreffo 2004).

Numa primeira abordagem, os factores de osteoinducção foram encapsulados ou adsorvidos à superfície de microsferas biodegradáveis utilizadas como sistema de libertação de fármacos. As microsferas são normalmente ligadas a matrizes para manter a estrutura e localização específica.

A capacidade do transportador reter a dosagem por tempo suficiente que permita a invasão das células vizinhas é crítica para promover a formação do osso e deve ser considerada para cada tipo de aplicação. Os hidrogéis surgiram como um veículo atractivo para uma efectiva libertação de factores de crescimento na regeneração do osso. Estas matrizes injectáveis (frequentemente de óxido de polietileno - PEO ou alginato) podem se conformar ao defeito *in situ* imobilizando factores de crescimento, com fácil manipulação (Katz 1996).

Muitos materiais têm sido investigados de modo a funcionarem como matrizes osteoconductivas, sistema de libertação osteoinductivos ou veículos para transplantação de células, incluindo materiais inorgânicos como biocerâmicos ou metais, já mencionados acima, e polímeros naturais ou sintéticos.

Uma grande variedade de polímeros naturais e derivados, tais como colagénio, fibrina, gelatina e alginato têm sido usados como matrizes para regeneração do osso devido à sua biocompatibilidade, capacidade de remodelação e existência de componentes naturais que podem provocar a adesão celular. A utilização de polímeros não naturais reduz o risco de transmissão de doenças associados aos materiais naturais.

As matrizes osteoconductivas têm demonstrado valor clínico por fornecerem uma estrutura para o crescimento celular, mas não promovem a formação de novo osso (Bucholz 2002). A libertação de moléculas osteoinductivas, aceleram a formação do osso uma vez que activam células progenitoras ou osteoblastos a migrarem para a fonte da libertação dos factores de crescimento, formando novo tecido ósseo. Devido ao curto tempo de vida da maioria dos factores de crescimento (20-30 minutos no caso das BMPs – *bone morphogenetic protein*), e o tempo requerido para a reparação óssea (semanas ou meses), é necessário, por vezes, uma libertação contínua de substâncias

osteogénicas para alcançar uma significante regeneração no osso (Bucholz 2002). Muitas das BMPs, TGF-β (*transforming growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), factores de crescimento dos fibroblastos, têm sido investigados para a capacidade de regenerar osso *in vivo*. Apesar de todo o sucesso na libertação controlada de factores de crescimento a partir de matrizes, para obter regeneração do osso requer concentrações suprafisiológicas de proteína, aumentando assim exorbitantemente os custos.

7.3. TERAPIA GÉNICA PARA REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO DO OSSO

Apesar de resultados promissores estarem extensamente documentados, continuam a existir os problemas de estabilidade e actividade biológica na libertação das BMPs. Assim, a libertação directa não é activa durante tempo suficiente para promover uma formação efectiva do osso. Outra limitação está associada aos custos de produção; a concentração adequada para o tratamento de uma fractura normal torna o tratamento demasiado dispendioso.

A terapia génica pode aumentar a osteoinducção pela expressão de factores de crescimento que aumentam a diferenciação dos osteoblastos, facilitam a produção de matriz e a migração dos osteoblastos. A maioria dos trabalhos desenvolvidos em terapia génica baseia-se na utilização de vírus, nomeadamente os adenovírus e os retrovírus. No caso da regeneração do osso, uma libertação local de genes é o método mais desejado. Existem duas técnicas disponíveis para terapia génica local: libertação directa (*in vivo)* ou o transplante de osteoblastos modificados para o progenitor (*ex vivo)*.

As células progenitoras e estaminais são muito promissoras em engenharia de tecidos dado serem uma potencial fonte de quase todas os tipos de células que participam na formação do osso. As células estaminais retém a capacidade de gerar quase todos os tipos de células adultas mas devido a questões éticas o seu uso é limitado. Uma variedade de células progenitoras derivadas de tecidos adultos, principalmente da medula óssea tem sido transplantadas e demonstrado participação na regeneração do osso. O transplante de células da

medula (*bone marrow stromal cells*) tem demonstrado a capacidade de induzir a formação do osso sem a adição de factores de crescimento, provavelmente por causa da sua capacidade de segregar factores que mantém seu crescimento e diferenciação em osteoblastos. A colheita de células da medula pode ser feita rapidamente, não provocando a morte de tecidos como é comum nos autoenxertos. No entanto, a medula óssea não pode fornecer um elevado número de células, sendo que as osteogénicas diminuem com a idade.

As células estaminais podem ser obtidas a partir das células da medula, e ambas participam na formação do osso Outros tecidos têm sido investigados como fonte de células estaminais pluripotentes na produção do osso, tais como as células estaminais isoladas do tecido adiposo e dos dentes de transição humanos (dentes de leite) (Leach and Mooney 2004). A utilização de células progenitoras oferece numerosas vantagens relativamente às células maduras, incluindo o facto de ser menos invasiva e destrutiva e com grande potencial de crescimento. Um grande número de células pode ser obtido a partir de uma pequena quantidade de percursores, o que é uma boa estratégia no caso de pacientes idosos. Para além disso, as células estaminais e as células da medula óssea alogénicas não provocam respostas imunitárias significantes tendo uma menor sensibilidade à baixas condições de oxigénio, sendo maior a sobrevivência depois da transplantação (Dragoo, Choi et al. 2003).

7.4. DESAFIO: VECTORES NÃO VIRAIS PARA TERAPIA GÉNICA EM OSTEOBLASTOS

O futuro da engenharia de tecidos do osso conduz a um sistema que seja seguro, reprodutível e simples, sendo aplicáveis na maioria das doenças ou lesões que necessitem de substituição do tecido ósseo. A utilização de vectores virais coloca uma série de problemas devido à existência de resposta imunitária e possíveis alterações genéticas no caso dos vectores que se integram no genoma do hospedeiro. Existem vários exemplos de terapia génica utilizando vectores virais para a formação de osso *in vivo* e *in vitro.* A utilização

de vectores não virais é um processo em que a eficiência é relativamente baixa, os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos, e, existem poucos trabalhos demonstrando o uso destes métodos na engenharia de tecidos do osso (Partridge and Oreffo 2004). No entanto, apresentam vantagens que demonstram claramente ser uma abordagem a considerar. Para além de todas as referidas como vantagens dos sistemas não virais, isto é, não tóxicos, não imunogénicos, seguros e de simples preparação, a expressão de uma proteína como consequência da internalização do novo gene é um evento transiente, que é altamente desejável em muitas aplicações da regeneração de tecidos uma vez que a produção dos factores de crescimento só é desejada durante uma duração de tempo específica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAS CELULARES MG-63, MC3T3-E1 E 293T

As linhas celulares utilizadas no trabalho experimental foram:

- A linha celular MG-63, proveniente de um osteosarcoma humano, cujas células exibem características fenotípicas características de osteoblastos indiferenciados, o que inclui a síntese de colagénio tipo I e III, uma baixa expressão de fosfatase alcalina e produção de osteocalcina;

- A linha celular MC3T3-E1, derivada do calvário de ratinhos recém nascidos, com capacidade de se diferenciar em osteoblastos e produzir colagénio tipo I, fosfatase alcalina e osteocalcina;

- A linha celular 293T, proveniente de células embrionárias de rim humano, são derivadas da linha celular 293, tendo sido inserido no seu genótipo um antigénio T para o SV40, o que as torna mais transfectáveis.

1.1. CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES MG-63, MC3T3-E1 E 293T

1.1.1 DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS

O trabalho experimental foi desenvolvido em culturas de células com 8 a 15 passagens. Estas células encontravam-se congeladas em meio completo com 10% de DMSO (Dimetilsufóxido), em azoto líquido, a –120º C.

No processo de descongelamento, as ampolas com células a – 120º C foram transferidas para o banho a 37º C sob agitação suave. Colocou-se o conteúdo das ampolas de células da linha MG-63 e MC3T3-E1 em tubos com 5ml de

Minimal Essential Medium – alpha medium (α-MEM) (Gibco) com 10% v/v de soro (FBS –soro fetal bovino, Gibco)), 1% de fungizona 1% (Gibco), 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Sigma) (10.000 unidades de penicilina e 10.000 µg de estreptomicina por ml) e 0,5% de gentamicina 10 mg/ml (Gibco), agitando suavemente. Para as células da linha 293T foi utilizado meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) com 10% de FBS inactivado e 1% de solução de penicilina-estreptomicina. Para a inactivação do soro (FBS), as respectivas alíquotas foram incubadas a 60º C durante 30 minutos. Centrifugou-se o conteúdo de cada ampola a 700 rpm durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o pellet em 2 ml de meio. Transferiu-se para um frasco de cultura perfazendo-se o volume de 8 ml com meio α-MEM ou DMEM completo.

1.1.2. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS E SUBCULTURA (TRIPSINIZAÇÃO)

Para a manutenção e crescimento das células em frascos, estes foram mantidos em estufa a 37º C, em atmosfera húmida com 5% de CO_2. Tendo em conta a quantidade inicial de células, o estado de confluência e a cor do meio, este foi substituído cerca de 2 a 3 vezes por semana.

Uma vez atingido o estado de semi-confluência entre as células de um frasco, estas foram subdivididas, por tripsinização.

Neste processo, após rejeitar o meio que estava no frasco, as células e o frasco foram lavados com 5 ml de Tampão Fosfato (PBS) 1x, estéril (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; a pH=7,4). Após adicionar 2ml de solução de tripsina (0.25 w/v%, 0.1w/v de glicose e 0.05w/v de EDTA e, PBS 1x, pH 7.5) o frasco foi colocado na estufa de CO_2 a 37º C durante cerca de 5 minutos. Findo este tempo, era adicionado ao frasco 6 ml de meio de cultura completo, parando deste modo, a acção da tripsina. Posteriormente, de acordo com a concentração pretendida, as células eram distribuídas por diferentes frascos ou placas perfazendo o volume final pretendido meio de cultura completo.

2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

2.1. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS POR HIDRATAÇÃO/EXTRUSÃO

As formulações de lipossomas constituídos por Dotap/Dope (*1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane* e *2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine)* e Dotap/Colesterol (Avanti Polar Lipids, Inc.) foram obtidas a partir de soluções stock de lípidos preparadas previamente em clorofórmio(Merck), c om uma concentração de 25 mg/ml.

Os lípidos foram misturados, em tubos de vidro previamente lavados com clorofórmio, nas proporções adequadas (lípido catiónico/lípido neutro) de modo a obter a razão molar pretendida (1/1), e a concentração final de 4 μM. Procedeu-se à remoção do clorofórmio da solução lipídica por evaporação até à secura, sob fluxo de azoto, rodando o balão de modo a formar um filme lipídico. De modo a eliminar todo o clorofórmio, o filme foi ainda colocado sob vácuo durante cerca de 8 horas.

A fim de se obterem vesículas multilamelares (MLV), o filme lipídico obtido foi hidratado com 1 ml de água ultra pura, obtida pelo aparelho Millipore MilliQ. As vesículas foram sujeitas a sonicação (Sonorex RK100, Bandelin, Berlin, Germany) durante 3 minutos e, seguidamente, extrudidas 21 vezes através de membranas de policarbonato com poro de 50 nm de diâmetro, sendo para o efeito utilizado um dispositivo de dupla seringa (Mini-extruder, Avanitilipids). Deste modo obteve-se uma suspensão lipossómica composta por lipossomas unilamelares pequenos (SUVs).

Após uma diluição de 4 vezes, foram conservados no frigorífico a 4º C por um período máximo de 20 dias.

2.2. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR LIPÍDICO DOS LIPOSSOMAS

2.2.1. MÉTODO DE FISKE E SUBBAROW

Este método baseia-se na análise colorimétrica de um complexo fosfomolibdato que, depois de reduzido, apresenta coloração azul (azul de molibdénio) de intensidade proporcional à quantidade de fosfato inorgânico existente na amostra, e resultante da hidrólise acídica dos fosfolípidos.

Para tubos de vidro resistentes a altas temperaturas, previamente lavados com uma mistura de clorofórmio/metanol, foram adicionados volumes crescentes (50; 100; 200 e 400 μl) de solução padrão de fosfatos (KH_2PO_4, 0,65 mM) e de 100 μl da suspensão de lipossomas. Foi adicionado a cada tubo 0,5 ml de ácido perclórico a 70%, procedendo-se à digestão ácida durante duas horas (a 180ºC em banho de areia). Um tubo apenas com ácido perclórico funcionou como "branco".

Após arrefecer as amostras até a temperatura ambiente, adicionou-se 5 ml de reagente de molibdato de amónio (Solução de molibdato de amónio (Sigma) a 0,22% em H_2S0_4 a 2%) provocando a conversão do fosfato inorgânico em ácido fosfomolíbdico. De seguida foi adicionado a cada tubo 0,3 ml de reagente de Fiske (Fiske-Subbarow reducer, Fluka), levando à conversão do ácido fosfomolíbdico em azul de molibdénio.

Os tubos foram aquecidos em banho de água fervente durante 15 minutos e arrefecidos à temperatura ambiente, lendo-se, espectofotometricamente (Shimadzu UV-1201 Spectrophotometer), à densidade óptica de 830 nm.

Com os valores obtidos para os padrões traçou-se uma curva de calibração (nmoles de fosfato vs. Abs.) e por regressão linear calculou-se a quantidade de fosfatos existente no volume de amostra analisado. De acordo com as proporções existentes entre o DOTAP e os fosfolípidos (1:1) foi calculada a concentração total de lípido existente na amostra.

2.2.2. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL DOS LIPOSSOMAS

Nos lipossomas produzidos a partir da formulação DOTAP-Colesterol, a quantidade total de lípido foi determinada a partir da quantificação do colesterol total. Esta foi feita utilizando *Infinity Cholesterol Liquid Stable Reagent* (Thermo Electron Corporation). Este método baseia-se na hidrólise enzimática dos ésteres do colesterol pela colesterol esterase, resultando colesterol e ácidos gordos livres. O colesterol livre é então oxidado pela colesterol oxidase, resultando colest-4-n-3-ona e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio combina-se com o ácido hidróxibenzóico e 4-aminoantipirina originando um cromóforo (corante quinonaimina) o qual pode ser quantificado espectofotometricamente a 500 nm.

Para a determinação do colesterol total dos lipossomas, foram preparados padrões com 38, 76 e 152 nmol de colesterol e 60 µl da solução de lipossomas. Adicionou-se 300 µl do reagente *Infinity Cholesterol* e 300 µl de água a cada amostra, sendo incubadas durante 5 minutos a 37ºC. Após arrefecer as amostras à temperatura ambiente, leu-se a absovância a 500 nm, subtraindo aos valores obtidos na amostra, os valores dos brancos (reagente *Infinity Cholesterol* e água). Com os valores obtidos para os padrões traçou-se uma curva de calibração (nmoles de colesterol vs. Abs.) e por regressão linear calculou-se a quantidade de colesterol existente no volume de amostra analisado. De acordo com as proporções existentes entre o DOTAP e o colesterol (1:1) foi calculada a concentração total de lípido existente na amostra.

3. ESTUDOS DE TRANSFECÇÃO UTILIZANDO LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

3.1. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS

Cerca de 24 horas antes das experiências as células foram submetidas ao

processo tripsinização. Ressuspendeu-se o sedimento em meio de cultura apropriado, de forma a obter a densidade celular pretendida. Para tal procedeu-se à contagem das células pelo método do *Trypan Blue.*

Após homogeneizar bem a suspensão celular, retiraram-se alíquotas de 1 ml para placas "multiwell" de 48 poços (Greiner bio-one). As placas foram colocadas na incubadora a 37ºC, sob uma atmosfera humidificada e com 5% de CO_2, durante 24 horas obtendo-se uma confluência de aproximadamente 60%.

3.1.1. CONTAGEM DE CÉLULAS PELO MÉTODO DO *TRYPAN BLUE*

Misturou-se num tubo *eppendorf*, 20 μl de trypan blue (trypan Blue Solution, 0,4% Sigma) e 20μl da suspensão celular. Colocaram-se 20μl da suspensão preparada numa câmara de newbauer e procedeu-se à contagem. As células viáveis não incorporam o corante, aparecendo brancas. Contrariamente, as células inviáveis, aparecem azuis. O volume de cada quadrado em que se procedeu à contagem corresponde a 10^4 ml.

3.2. AMPLIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMÍDICO

Bactérias competentes *E. coli* DH5-α foram transformadas com o plasmídeo pCMVluc e pCMVβ-gal, gentilmente cedidos pelo Doutor Henrique Faneca (Universidade de Coimbra) e pela Doutora Ana Paula Pêgo (INEB), respectivamente.

Procedeu-se à extracção do DNA plasmídico, utilizando o Maxi-prep Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A purificação pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Sigma) seguiu o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (l989).

A determinação da concentração e da pureza do DNA obtido, foi feita a partir da leitura da absorvância a 260 nm e da razão entre a medição da absorvância a 260 e 280 nm, respectivamente.

A digestão do DNA foi realizado com a enzima de restrição SalI (Fermentas), num volume final de 20 μl. As reacções continham cerca de 500 ng de DNA, 4μl de tampão de reacção como discriminado pelo fabricante, 10 μl de água desionizada 2 μl da enzima de restrição. A reacção foi incubada durante 2 horas a 37º C. A análise foi feita a partir de uma alíquota da digestão contendo 4 μl de *loading buffer* (Fermentas) em gel de agarose (Gibco) 1% com EtBr (Sigma) 1ug/ml, em TAE (Biogen) 1x) por migração electroforética a 100 volts durante cerca de 90 minutos. A observação das bandas foi feita sob luz ultra-violeta (UV), emitida pelo transiluminador.

3.3. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS/DNA

A preparação dos complexos foi feita imediatamente antes da adição às células, sob condições assépticas, utilizando soluções estéreis (filtro 0.22 μm, Tpp).

Sabendo que a 1 μg de DNA correspondem 3,03 nmoles de cargas negativas, correspondentes aos grupos fosfato, calculou-se o volume necessário da suspensão lipossómica diluída de modo a obter complexos lípido-DNA com a razão de carga 1/2, 1/1, 21, 3/2 e 4/1 .

A cada tubo adicionou-se respectivamente, 100 μl de tampão HBS (*Hepes-buffered saline*), o volume de lipossomas de modo a obter-se as razões de cargas desejadas, agitando ligeiramente o tubo e, lentamente, 100 μl de solução de DNA (contendo 1 μg de DNA).

Após a adição do DNA esperou-se 15 minutos para permitir a formação dos lipoplexos.

No caso da preparação dos complexos ternários, com transferrina, inicialmente

colocou-se no tubo 100 μl de uma solução de transferrina (Holo-transferrin Human, Sigma-Aldrich) em HBS (320 μg/ml). Adicionou-se de seguida o volume de lipossomas de modo a obter a carga desejada. Após 15 minutos, juntou-se 100 μl de solução de DNA (contendo 1 μg de DNA). Como o descrito anteriormente, esperamos 15 minutos para a formação dos complexos. Os complexos com transferrina foram preparados na razão lípido catiónco-DNA de 1/1, 3/2 e 2/1.

A fim de realizar o controlo das experiências, utilizou-se Lipofectamina® (invitrogen), preparando-se os compexos de acordo com as instruções do fabricante (0.5 μg de DNA em 3 μl de reagente). Foram também feitos controlos com a aplicação de 1 μg de DNA livre a cada poço e com células sem seres sujeitas à transfecção (controlo negativo).

3.4. TRANSFECÇÃO

Após lavar duas vezes as células com meio de cultura a 37°C, desprovido de soro e antibióticos, adicionou-se a cada poço 0,3 ml do mesmo meio.

Seguidamente foi adicionado lentamente a cada poço o volume de complexos correspondente a 1 μg de DNA (preparados como descrito em 3.3). Incubou-se a durante 4 horas na estufa a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO_2 e, findo este tempo, o meio com os complexos foi substituído por 1 ml de meio de cultura completo (com soro e antibióticos). As células foram incubadas por um período de 48 horas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO_2, sendo a actividade avaliada ao fim desse tempo.

3.5. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA LUCIFERASE

A enzima luciferase, codificada pelo gene *luc* catalisa uma reacção de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2. Na presença desses reagentes e mediante a acção da luciferase presente no

lisado das células, ocorre uma reacção de oxidação da luciferina com emissão de luminescência, que decai rapidamente. O sinal luminoso é detectado por um luminómetro. A emissão total de luz é proporcional à actividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflecte a taxa de transcrição do gene "repórter" sob acção do promotor em estudo.

De forma a determinar a expressão pelas células do plasmídio contendo o gene que codifica a luciferase, terminadas as 48 horas de incubação após a transfecção, procedemos à lavagem das células com 1 ml de PBS. Adicionou-se 100 μl de Tampão de Lise Celular (DTT 1 mM; EDTA 1 mM; Tris-fosfato 25 mM (pH=7,8); $MgCl_2$ 8 mM; Glicerol 15%; Triton X100 1% (v/v)). O lisado foi centrifugado a 14000 rpm durante 4 minutos.

Pipetou-se para os poços de placas de leitura de 96 poços opacas (VWR) , 20μl do sobrenadante das amostras. Preparou-se, seguidamente, o "software" do luminómetro (Vienna, Áustria) para a adição, a cada poço, de 100μl de Solução de Luciferina (D-luciferina na forma de sal de sódio, Sigma, 167 μM) e 100 μl de Tampão de Leitura da Luciferase (DTT 1 mM; EDTA 1 mM; Tris-fosfato 25 mM (pH=7,8); $MgCl_2$ 8 mM; Glicerol 15%). Imediatamente antes do início da análise, o volume de uma solução de ATP (sal dissódico, Sigma) necessário para obter uma concentração final de 2 mM.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA β-GAL

A enzima β–galactosidase, codificada pelo gene *lacZ,* cataliza a hidrólise do orto-nitrofenil-β -D-galactosídeo (ONPG) convertendo-o em galactose e orto-nitrofenol. O orto-nitrofenol é uma solução de coloração amarela, cuja absorvância pode ser medida a 420nm.

Passadas as 48 horas de incubação após a transfecção, após lavar as células com 250 μl PBS, foi feita a lise das células com tampão de lise (100 μl/ well) (0,1%w/v Triton-X, 0.25 M Tris-base, pH=8), sendo incubadas *overnight* a –80º C. O lisado de cada poço foi centrifugado durante 15 minutos a 14.000 rpm,

recolhendo-se o sobrenadante. Numa placa de 96 poços, foi adicionado sequencialmente 30 µl de PBS, 20 µl de amostra e 150 µl da solução de ONGP (ONGP a 1,5 mg/ml em 60 mM de tampão fosfato di-básico, 1 mM $MgCl^2$, 10 mM KCl, 50 mM de β-mercaptoetanol, pH=8). Após incubação na estufa a 37º C durante 1 hora, foi lida a absorvância a 420 nm (Sunrise, Bio-Rad).

Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de enzima por miligrama de proteína, por extrapolação a partir da recta padrão (ver 3.5.1). Uma vez que as células podem apresentar actividade endógena de β-galactosidase, a absorvância obtida na células não transfectadas foi subtraída às amostras transfectadas.

3.6.1. PREPARAÇÃO DA RECTA DE CALIBRAÇÃO

Para a preparação da recta de calibração, o padrão da β-Ga (Sigma)l foi diluído sucessivamente em tampão (10 mM Tris-base, 10 mM $MgCl^2$, pH=8), de forma a obter valores entre 0 e 135.72 µg/ml. Em placa de 96 poços, foi adicionado a 20 µl de cada amostra padrão, 20 µl de tampão de lise, 10 µl de PBS e 150 µl de solução de ONPG. Após incubação na estufa a 37º durante 1 hora, foi lida a absorvância a 420 nm.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

A determinação da proteína total foi realizada com o kit *BCA Protein Assay* (Pierce). O método baseia-se no princípio da redução pelas proteínas de Cu^{2+} em Cu^{+}, em meio alcalino (reacção do biureto). Quando duas moléculas de BCA são quelatadas por um ião cobre, há o desenvolvimento de cor púrpura cuja absorvância a 562 nm é directamente proporcional à quantidade de proteína existente.

Foram preparados padrões de proteína albumina sérica bovina (BSA) , em água, com as seguintes concentrações: 0 (branco); 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2.5; e 5 (mg/ml). Preparou-se a solução de BCA/$CuSO^4$ conforme as instruções do fabricante. Numa placa de 96 poços, foi adicionado a cada poço, 20 μl de amostra e 200 μl da solução de BCA/$CuSO^4$. No caso dos padrões, adicionou-se 10 μl da solução padrão e 200 μl da solução de BCA/$CuSO^4$. Após incubar 1 hora a 37ºC, foi determinada a absorvância a 540 nm. Obtemos assim uma curva de calibração e, por regressão linear, a concentração de proteínas das amostras.

3.8. MARCAÇÃO (STAINING) PARA A ACTIVIDADE DA B-GALACTOSIDASE.

As células transfectadas e que expressam a β-Galactosidase depois de fixação e incubação com o substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactoside) catalisam uma reacção na qual há desenvolvimento de cor azul, podendo ser visualizadas ao microscópio.

Passadas as 48 horas de incubação após o processo de transfecção descrito em 3.4, as células foram lavadas com PBS 1x. Fixaram-se as células com 250 μl de paraformaldeído (Sigma) a 4% em PBS, deixando à temperatura ambiente 15 minutos. Lavou-se 2 vezes com PBS 1x.

Foi adicionado a cada poço 150 μl da solução de X-Gal (X-Gal 1 mg/ml; ferrocianeto de potássio (1.6 mg/ml); ferricianeto de potássio (2,12 mg/ml; $MgCl_2$ 2 M em PBS 1x), sendo incubadas a 37º C durante 3 horas. A solução de X-Gal foi substituída por PBS, sendo então visualizadas ao microscópio. Foi feita uma análise qualitativa para as várias observações.

4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O teste MTT é um teste colorimétrico em que a clivagem dos sais de tetrazólio (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), origina cristais púrpura de formazano. Uma vez que esta clivagem é feita por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente activas, a quantidade de formazano formada é directamente proporcional ao número de células viáveis.

Após transfecção das células, como descrito em 3.4, o meio de cultura foi substituído por 200 μl de meio de cultura completo a 37º C, sem vermelho de fenol. Adicionou-se 20 μl de solução de MTT (Sigma) (5mg/ml em PBS) e incubou-se durante 3 horas em estufa a 37°C com atmosfera húmida e 5% de CO_2. Findo esse tempo, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 400 μl de DMSO (Merck), que após ressuspender foi centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante (200 μl) foi transferido para uma placa de 96 poços sendo lida a absorvância a 540 nm. O DMSO foi utilizado como branco.

Os resultados foram expressos como densidade óptica após a subtracção dos valores dos brancos. A análise dos resultados foi feita comparando os valores de absorvância obtidos nos controlos (células não transfectadas) com os valores das amostras do ensaio.

5. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PROTECÇÃO DO DNA CONFERIDO PELOS COMPLEXOS

Os lipoplexos foram submetidos a um ensaio experimental que permite concluir acerca da condensação e protecção do DNA nos referidos complexos. Para isso teve-se em conta a avaliação da extensão de degradação do material genético produzida pela DNase I e o acesso do brometo de etídio (EtBr) ao DNA, em suspensões lipossómicas, na ausência e na presença do detergente Triton, 10% .

As determinações experimentais efectuaram-se num fluorímetro (SPEX-Fluorolog 1681), após ajuste dos parâmetros necessários à leitura da fluorescência emitida pelo EtBr: Comprimento de onda de excitação - 518 nm; Comprimento de onda de emissão - 605 nm; Fenda de excitação - 1 mm; Fenda de emissão - 2 mm.

Determinou-se o valor de fluorescência basal do HBS e, numa cuvete contendo 2 ml de HBS e 10μl de EtBr (solução stock a 2,5 mM) determinou-se a fluorescência basal do EtBr. Paralelamente, em 2 ml de HBS e 1μg de DNA, determinou-se o valor de fluorescência correspondente à intercalação da sonda de EtBr na referida quantidade de DNA, que constitui o acesso completos da sonda ao DNA. Todas as determinações foram feitas na ausência e na presença de detergente (Triton 10%) (Sigma).

Prepararam-se os diferentes complexos lipossoma catiónico/DNA e a amostra controlo (apenas com DNA), utlizando 2,5 μg de DNA. Submeteu-se metade do volume de cada preparação dos complexos à acção da DNase I, preparada no tampão Tris-HCl 50 mM (pH=7,5), MnCl2 10 mM, BSA 50 μg/ml, (10 unidades DNase I por μg de DNA), durante 30 minutos a 37º C. Terminada a incubação, inactivou-se a enzima com uma solução de EDTA 0,5M (1μl/unidade de DNase I).

Foram efectuados ensaios paralelos usando a outra metade do volume da mesma preparação lipossómica, após a sua incubação, nas mesmas condições experimentais, com a mesma quantidade de DNase I, mas previamente inactivada com a referida solução de EDTA (2 minutos), servindo esta de controlo.

Para a determinação no fluorímetro, pipetou-se para uma cuvete de fluorímetro um volume de HBS a 37º C de modo a que o volume final após adição dos complexos fosse de 2 ml. Adicionou-se 10 μl de EtBr (2,5 mM) e manteve-se a cuvete sob agitação magnética a 37°C. Adicionou-se os lipoplexos (volume correspondente a 1,25 μg de DNA) e efectuou-se a leitura dos valores de fluorescência antes e após a adição detergente (10 μl de triton 10%).

Para todos os valores obtidos, foi subtraído o valor da fluorescência residual emitida pelo EtBr+HBS. Assim, considerando que a fluorescência emitida pelo DNA, na presença de detergente e com a enzima DNase I inactiva corresponde a uma protecção do DNA de 100%, calculou-se a percentagem de DNA protegido em cada razão de carga, de acordo com a fluorescência do DNA, na presença de detergente e de DNase activa.

6. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

Para a determinação deste parâmetro utilizou-se a técnica de DELSA utilizando o aparelho Coulter® DELSA 440 (Coulter Electronics, Hialeh, FL, USA) cujo princípio de funcionamento é baseado na análise por desvio doppler da luz difractada por partículas em suspensão submetidas a electroforese.

A mobilidade electroforética das partículas analisadas *(U)* expressa em μm.cm/V.s é definida como a velocidade da partícula movendo-se sob a acção de um campo eléctrico e é calculada pelo desvio Doppler de frequências da luz difractada pelas partículas. O potencial zeta (ξ), expresso em mV, é definido como a diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula (*shear plane*) e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula.

No Coulter DELSA 440 o feixe de luz que incide sobre a amostra consiste num raio laser de neon-hélio e a análise da luz difractada pelas partículas é efectuada simultaneamente em quatro ângulos diferentes (8,6°; 17,1°; 25,6° e 34,2°) . A análise a quatro ângulos diferentes permite melhor resolução e a eliminação de ruídos.

O instrumento foi previamente calibrado com padrão de poliestireno de tamanho e potencial zeta conhecidos (Coulter Mobility Standard, EMPSL7). Os lipossomas, complexos binários e ternários (com transferrina) foram preparados num volume final de 2 ml, em tampão HBS à temperatura de 25º C.

Todos os complexos foram preparados imediatamente antes da análise. Depois de colocadas as amostras na célula adequada à medição, foi aplicada uma corrente de 4 mV. Os resultados apresentados representam a média ± o desvio padrão obtido pelos 4 diferentes ângulos.

7. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS COMPLEXOS

O tamanho dos complexos foi determinado, utilizando a técnica de *photon correlation spectroscopy* (PCS). Esta técnica utiliza o efeito da dispersão da luz para determinar as flutuações dependentes do tempo e resultantes do movimento Browniano das partículas em suspensão. A intensidade da interferência da luz num determinado ângulo fixo é detectado por um fotomultiplicador cuja corrente produzida passa por um sistema de autocorrelação, o qual a analisa em função do tempo, determinando assim o índice de difusão e consequentemente o seu tamanho.

As determinações foram feitas no aparelho Coulter® N4 Plus, sendo o ângulo de detecção fixo em 90º e as medições feitas durante 200 segundos. Os complexos foram preparados imediatamente antes da análise, em tampão HBS a 25º C num volume final de 2 ml.

Na análise foi possível determinar o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão, o qual nos dá informação sobre a homogeneidade da amostra.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados representam a média ± o desvio padrão de experiências feitas, pelo menos em triplicado (excepto a determinação da capacidade de protecção do DNA pelos complexos). Foi utilizada como avaliação estatística a análise de múltiplos valores ANOVA. O valor de $P<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS

A eficácia dos lipossomas como vectores é em grande parte dependente das suas propriedades físico-químicas. O tamanho e a carga superficial dos complexos são propriedades de grande relevância, pelo que se procedeu ao seu estudo para a caracterização dos complexos.

1.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E DO POTENCIAL ZETA DOS COMPLEXOS

O tamanho dos complexos foi determinado, utilizando o Coulter® N4 Plus, o qual se baseia na técnica de PCS (*photon correlation spectroscopy*). Esta técnica utiliza o efeito da dispersão da luz para determinar as flutuações dependentes do tempo e resultantes do movimento das partículas em suspensão. Na mesma análise foi possível determinar o índice de polidispersão, o qual nos dá informação sobre a homogeneidade da amostra.

O potencial zeta (ξ), foi determinado pela técnica de DELSA utilizando o equipamento Coulter® DELSA 440. O potencial zeta é expresso em mV, e é definido como a diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula. As figuras 11, 12 e 13 ilustram os resultados obtidos para estes parâmetros nos complexos preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1).

Na figura 11 estão representados os valores de potencial zeta obtidos para os lipossomas (com e sem transferrina), e para os complexos lipossoma catiónico-DNA (+/-) nas razões de carga de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1, 4/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf.

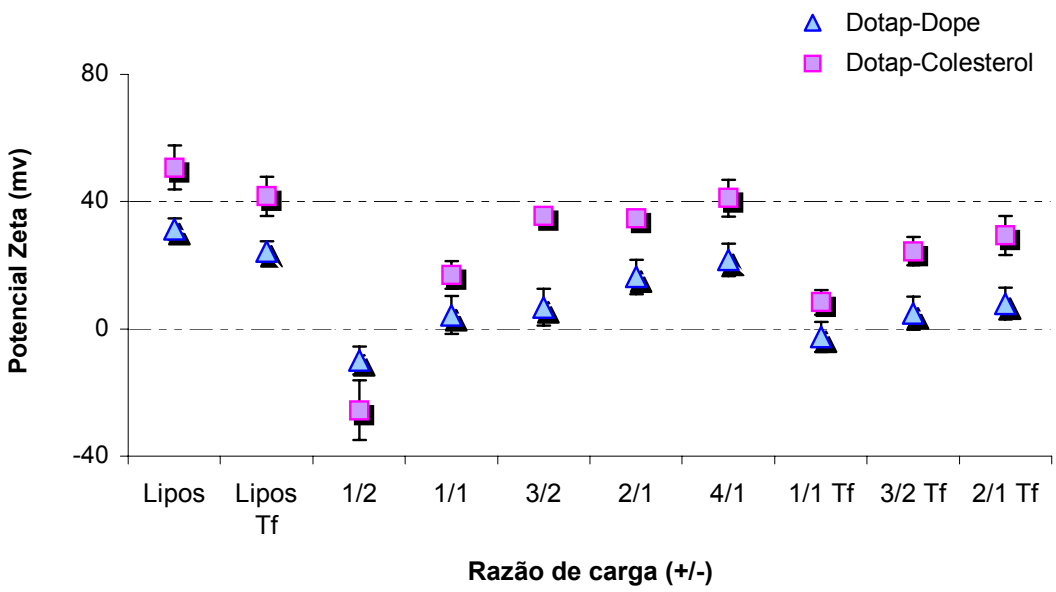


Figura 11 – Valores de Potencial Zeta dos complexos preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1) e DNA em diferentes razões de carga. Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA. A Média ± o Desvio Padrão representam os dados de 2 experiências independentes.

Verifica-se que os valores obtidos para os lipossomas livres (não complexados com o DNA) foram de +31 mV no caso da formulação DOTAP-DOPE e +51 mV com DOTAP-Colesterol. Nos lipossomas associados à transferrina (lipos. Tf), há uma diminuição nos valores de potencial zeta, apesar de esta não ser estatisticamente significativamente diferente. A complexação do DNA com os lipossomas catiónicos provoca uma diminuição dos valores de potencial zeta em comparação com o dos lipossomas livres. Na razão de carga 1/2 (+/-), os complexos apresentam uma carga global negativa, sendo os valores de –9 mV nos complexos com DOTAP-DOPE e –25 mV nos complexos com DOTAP-Colesterol. À medida que se aumenta a quantidade de lípido catiónico em relação ao DNA, há um aumento do potencial zeta, atingindo-se o valor máximo para a razão de carga 4/1, em que os valores são +21 mV e +41 mV, para as formulações DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol, respectivamente.

Para a mesma razão de carga, os complexos preparados com transferrina são menos positivos do que os complexos binários, apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas. É ainda de referir que, exceptuando a razão de carga 1/2, todos os complexos preparados com a formulação lipídica DOTAP-Colesterol apresentam valores de potencial zeta mais positivos do que os preparados com DOTAP-DOPE.

Na figura 12 estão representados os valores obtidos para o tamanho dos lipossomas, lipossomas associados à transferrina, complexos binários (razões de carga de 1/2, 1/1, 2/1, 3/2 e 4/1) e complexos ternários (razões de carga de 1/1, 3/2 e 2/1), para a formulação lipídica DOTAP-DOPE. Estão também representados os respectivos índices de polidispersão. Os lipossomas e os lipossomas associados à transferrina apresentam tamanhos entre os 110 e 160 nm, não diferindo significantemente entre si.

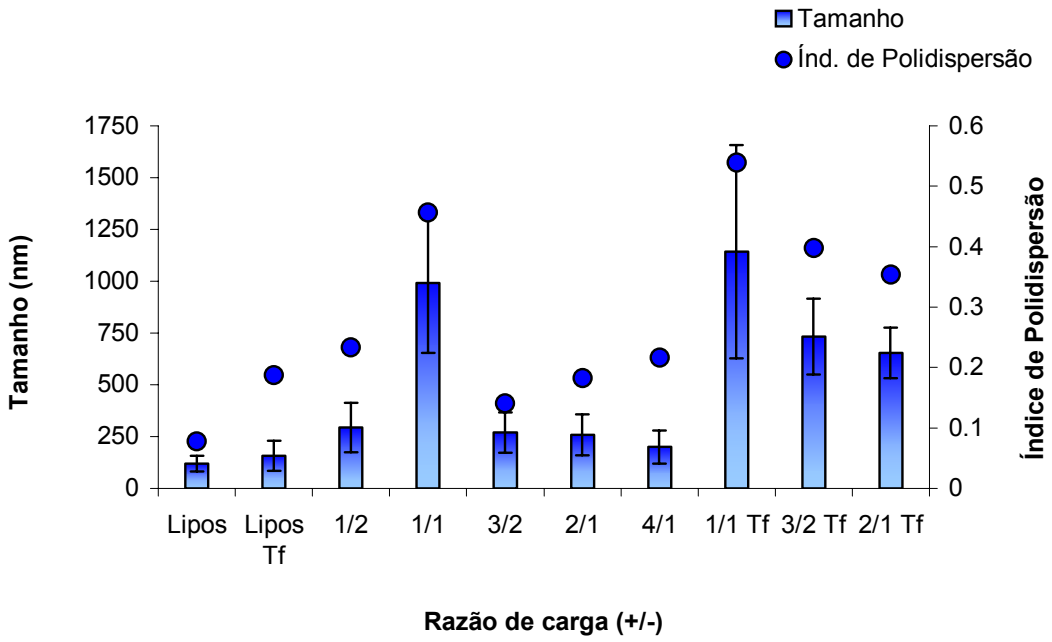


Figura 12 - Variação do tamanho médio e do índice de polidispersão nos complexos preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DNA em diferentes razões de carga. Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de 2 experiências.

A complexação dos lipossomas com o DNA provoca um aumento no tamanho dos complexos, apesar de não significativa para os complexos binários preparados na razão de carga de 1/2, 3/2, 2/1 e 4/1. Estes complexos apresentam tamanhos que variam entre os 200 nm e os 300 nm. Os tamanhos significativamente mais elevados correspondem aos complexos preparados nas razões de carga 1/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf. Os tamanhos dos complexos preparados nestas razões de carga variam entre os 650 nm (2/1 Tf) e os 1150 nm (1/1 Tf), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Relativamente ao índice de polidispersão, verifica-se que os valores mais elevados (entre 0.550 e 0.450) correspondem aos complexos de maior tamanho, o que nos dá indicação da heterogeneidade da amostra. No caso dos lipossomas associados à transferrina, é importante notar que apresentam índices de polidispersão mais elevados do que os dos complexos binários da mesma razão de carga.

Os valores obtidos para os tamanhos e índice de polidispersão dos complexos e lipossomas produzidos a partir da formulação DOTAP-Colesterol estão representados na figura 13. Os lipossomas com ou sem transferrina apresentam valores de cerca de 120 – 135 nm, não apresentando diferenças significativas entre si, nem em relação aos preparados com DOTAP-DOPE. Em relação aos complexos binários, as razões de carga 1/2, 3/2, 2/1 e 4/1 não apresentam diferenças significativas entre si em relação ao tamanho, apresentando tamanhos entre os 250 nm e 302 nm. À semelhança dos resultados obtidos para os tamanhos dos complexos preparados com DOTAP-DOPE, nas razões de carga 1/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf, os complexos atingem tamanhos significativamente mais elevados do que para as outras razões de carga (590 nm para 3/2 Tf e 950 nm para 1/1 Tf). Verifica-se que, apesar de não serem significativamente diferentes, os lipossomas com transferrina, e complexos das razões 1/2, 1/1, 1/1 Tf e 3/2 Tf preparados com DOTAP-Colesterol apresentam tamanhos menores que os preparados com DOTAP-DOPE.

Relativamente ao índice de polidispersão, verifica-se que os complexos com maiores tamanhos (1/1, 1/1 Tf, 2/1 Tf e 3/2 Tf) apresentam maiores índices de

polidispersão. No entanto, para todos os outros complexos (1/2, 3/2, 2/1 e 4/1), lipossomas com e sem transferrina, os índices de polidispersão são muito semelhantes, variando entre os 0.067 e 0.091. É importante referir que são mais elevados do que os obtidos para os complexos preparados a partir de DOTAP-DOPE.

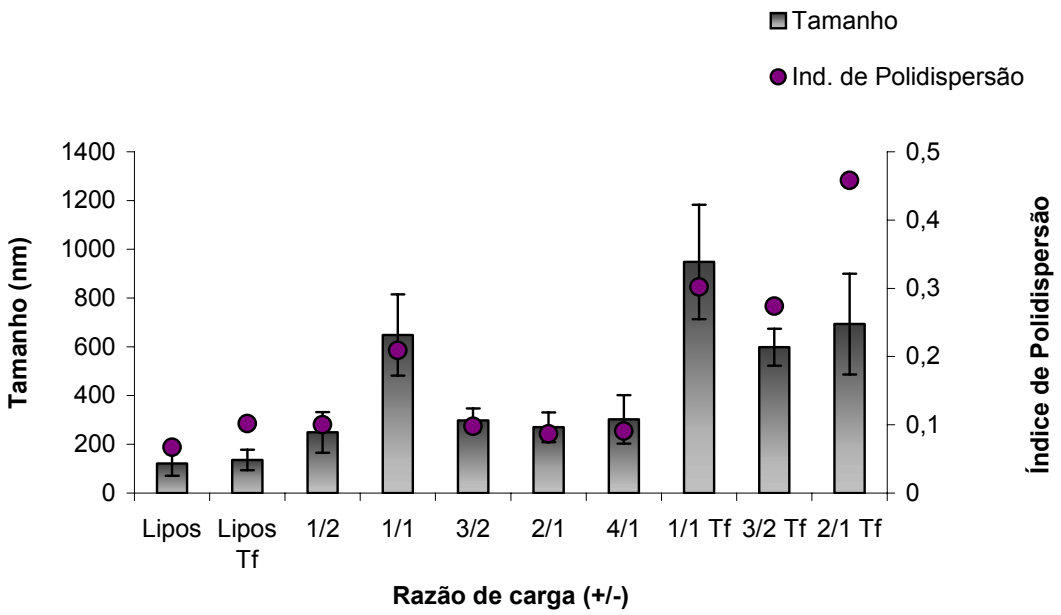


Figura 13 - Variação do tamanho médio e do índice de polidispersão nos complexos preparados com DOTAP-Colesterol (1:1) e DNA em diferentes razões de carga. Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de 2 experiências.

2. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE PROTECÇÃO DO DNA CONFERIDA PELOS COMPLEXOS

Evitar a degradação do DNA pelas nucleases é um factor crucial para o sucesso do processo de transfecção. Assim, procedeu-se a um ensaio a fim de

avaliar o grau de protecção do DNA pelos lipossomas catiónicos, nas várias razões de carga e formulações lipídicas estudadas.

O Brometo de etídio (EtBr) é uma molécula de reduzidas dimensões que, na ausência da completa condensação do DNA tem a capacidade de se intercalar na dupla hélice do DNA, resultando um aumento da fluorescência emitida. Deste modo, quanto mais acessível estiver a dupla cadeia de DNA, maior será, a incorporação do brometo de etídio na dupla hélice e, deste modo, maior será a fluorescência emitida pela sonda.

As determinações experimentais a fim de verificar a capacidade de protecção do DNA pelos lipossomas efectuaram-se num fluorímetro determinando-se o valor de fluorescência correspondente à intercalação da sonda de brometo de etídio (EtBr) no DNA. Avaliou-se a extensão de degradação do material genético produzida pela DNase I e o acesso do EtBr ao DNA, em suspensões lipossómicas, na ausência e na presença de detergente. Para todos os valores obtidos, foi subtraído o valor da fluorescência residual emitida pelo EtBr+HBS. Assim, considerando que a fluorescência emitida pelo DNA, na presença de detergente e com a enzima DNase I inactiva corresponde a uma protecção do DNA de 100%, calculou-se a percentagem de DNA protegido em cada razão de carga, na presença de detergente e de DNase activa como o descrito nos materiais e métodos.

A figura 14 representa a percentagem de DNA protegido, calculada a partir do acesso do brometo de etídio ao DNA dos complexos após incubação com 10 unidades de DNase I por μg de DNA, nas razões de carga (+/-) de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf. Os complexos foram preparados a partir de DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1).

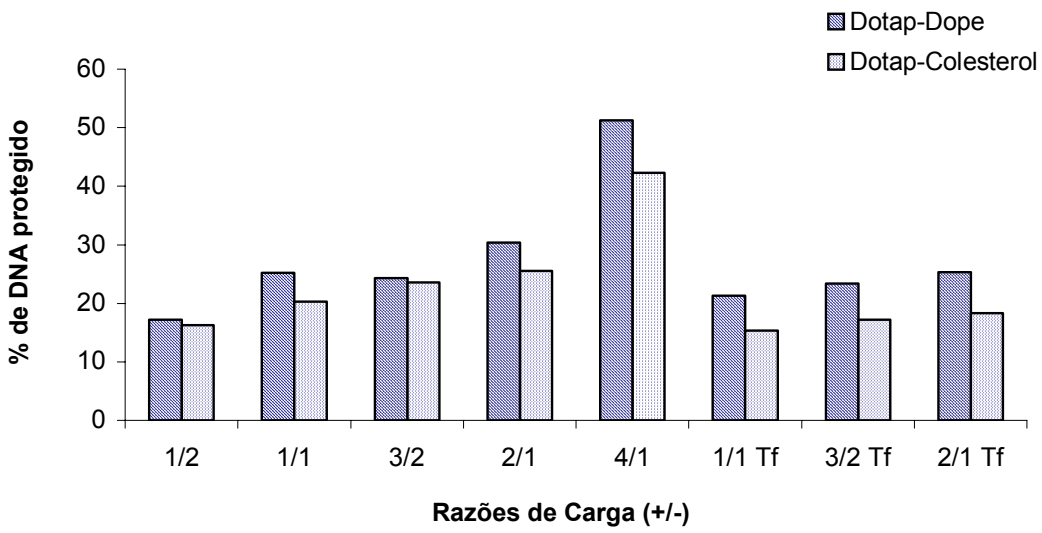


Figura 14 – Percentagem de DNA protegido calculada a partir do acesso do Brometo de Etídio ao DNA dos complexos após incubação com 10 unidades de DNase I por μg de DNA. Estão representados os valores para os complexos preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA

Verifica-se que o aumento da quantidade de lípido catiónico conduz a uma condensação mais eficiente do DNA e sua consequente protecção. Sendo assim, os níveis mais elevados de protecção foram obtidos com os complexos preparados na razão de carga de 4/1. Para esta razão de carga, cerca de 51% do DNA está protegido pelos lipossomas constituídos por DOTAP-DOPE e cerca de 42% para DOTAP-Colesterol. Os níveis mais baixos de protecção ocorrem nos complexos preparados na razão de carga de 1/2 e 1/1 Tf. A propósito, para a mesma razão de carga, os complexos com transferrina parecem ser ligeiramente menos eficazes na protecção do DNA.

Relativamente à formulação lipídica, com excepção das razões de carga 1/2 e 3/2, em que os valores são muito próximos, obteve-se uma maior percentagem de protecção nos complexos preparados a partir de DOTAP-DOPE.

3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

De acordo com trabalhos de outros autores, os lipossomas catiónicos podem ser tóxicos dependendo do tipo de células, da concentração lipídica e tempo de contacto (Woo-Jeong Choia, Jin-Ki Kima et al. 2004).

A percentagem de células viáveis foi determinada pelo teste do MTT 48 horas após o processo de transfecção, no qual as células estiveram em contacto com os complexos durante 4 horas. Os resultados foram expressos como % de células viáveis relativamente a um controlo de células não transfectadas. Deste modo, e porque o estudo da toxicidade de vectores para aplicação em terapia génica é de extrema importância, foram realizados estudos de viabilidade celular em diferentes tipos de células com as formulações lipídicas em estudo.

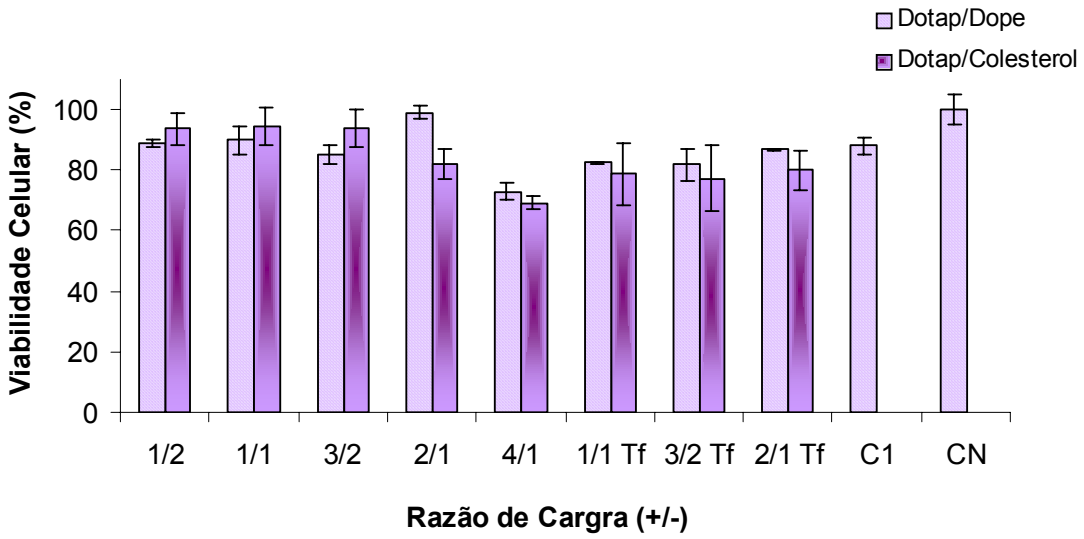


Figura 15 - Percentagem de viabilidade celular na linha MG-63 após serem sujeitas à transfecção com complexos nas razões de carga de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1 e 4/1. Os complexos foram preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA. Os complexos estiveram em contacto com as células durante 4 horas, avaliando-se a viabilidade ao fim de 48 horas. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

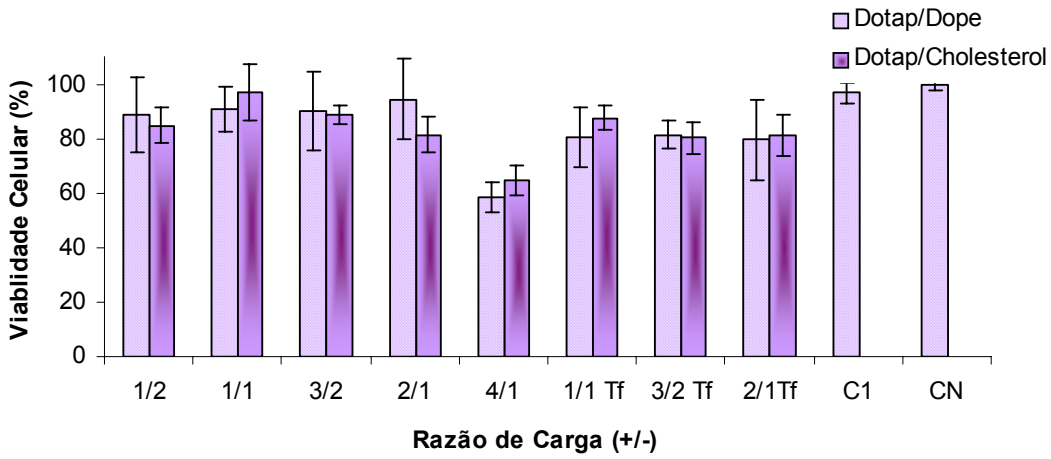


Figura 16 - Percentagem de viabilidade celular na linha MC3T3-E1 após serem sujeitas à transfecção com complexos nas razões de carga de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1 e 4/1. Os complexos foram preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA. Os complexos estiveram em contacto com as células durante 4 horas, avaliando-se a viabilidade ao fim de 48 horas. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

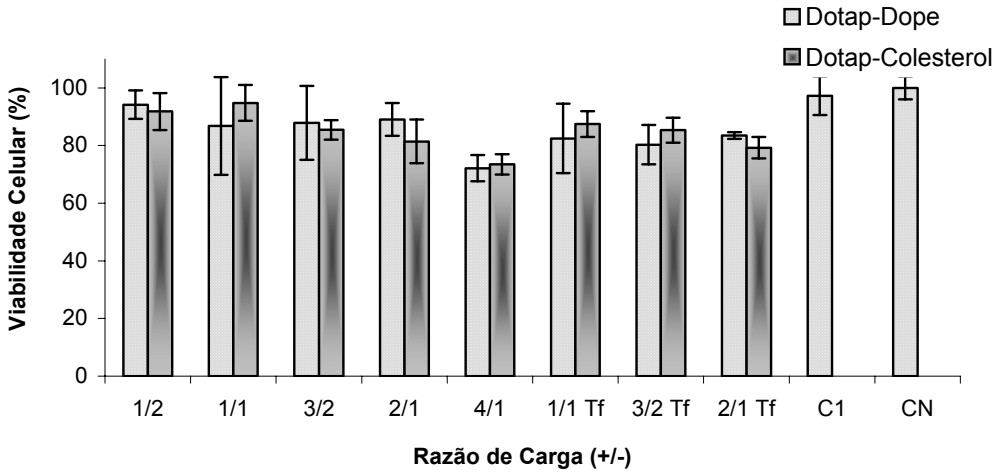


Figura 17 - Percentagem de viabilidade celular na linha 293T após serem sujeitas à transfecção com complexos nas razões de carga de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1 e 4/1. Os complexos foram preparados com DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA. Os complexos estiveram em contacto com as células durante 4 horas, avaliando-se a viabilidade ao fim de 48 horas. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

As figuras 15, 16 e 17 dão-nos indicação sobre o efeito citotóxico dos complexos lípido catiónico-DNA nas células das linhas MG-63, MC3T3-E1 e 293T, respectivamente. Em nenhuma razão de carga se verificam diferenças significativas na viabilidade celular depois da transfecção com DOTAP-DOPE ou DOTAP-Colesterol, o que demonstra que não existem diferenças de toxicidade entre as duas formulações lipídicas. Com excepção dos complexos preparados com razão de carga 4/1 (+/-), em todas as outras razões de carga e, para as duas formulações lipídicas, obteve-se uma viabilidade celular igual ou superior a 80%. No caso da razão de carga 4/1, o excesso de lípido parece exercer algum efeito citotóxico nas células uma vez que, nas três linhas celulares, os valores obtidos para a viabilidade celular são significativamente inferiores aos obtidos para todas as outras razões de carga – cerca de 70% nas linhas MG-63 e 293T e 60% nas células da linha MC3T3-E1.

4. INFLUÊNCIA DA DENSIDADE E CONFLUÊNCIA CELULAR

Inicialmente, utilizaram-se três densidades de células (20.000, 30.000 e 40.000 células por poço de 1 cm^2) a fim de determinar qual a melhor densidade celular inicial para transfectar células da linha MG-63. As células foram sujeitas aos mesmos tratamentos de tripsinização e 24 horas após o plaqueamento, foram transfectadas. Para todas as razões de carga (1/2, 1/1, 2/1 e 4/1), foi utilizado 1μg de DNA, correspondente a 3,03 nmol de cargas negativas. O plasmídio utilizado foi o pCMVluc, que codifica a enzima luciferase. Esta enzima catalisa a reacção entre luciferina, ATP e oxigénio, tendo como produto, para além de compostos químicos, a emissão de luz. A actividade de transfecção foi medida 48 horas após a substituição do meio de cultura contendo os complexos por meio de cultura novo. A emissão luminosa foi detectado por um luminómetro, sendo a quantidade de luz produzida após a adição do substrato, proporcional ao número à actividade das células transfectadas. Os valores obtidos foram expressos em unidades relativas de luz por miligrama de proteína, como demonstra o gráfico 8.

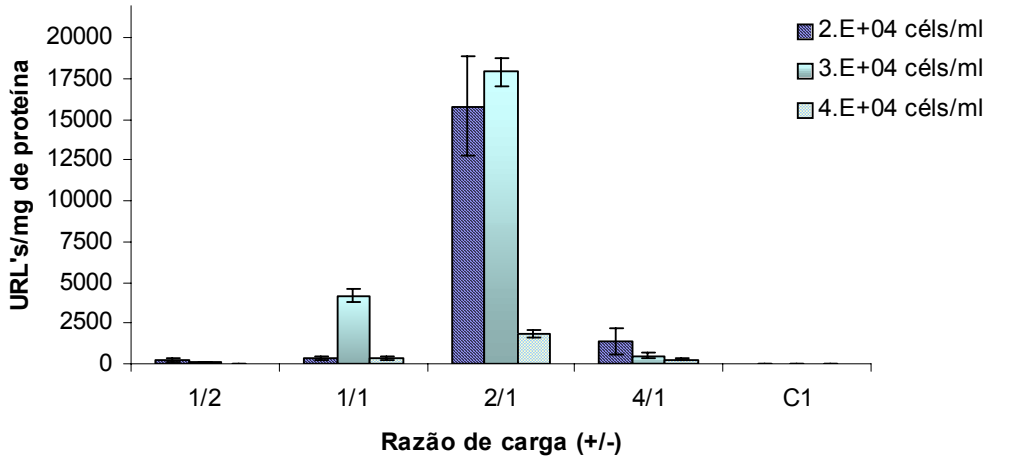


Figura 18 - Influência da densidade/confluência celular na actividade de transfecção da linha celular MG-63. Para o efeito foi utilizada a formulação DOTAP-DOPE na razão 1:1. C1 – Células transfectadas apenas com 1 μg de DNA. A média ± o desvio padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

Tendo em conta a figura 18, é clara a influência que a densidade celular e a razão de carga dos complexos têm na eficiência de transfecção das células da linha MG-63. Verifica-se que a melhor densidade celular para estes estudos situa-se entre $2x10^4$ e $3x10^4$ células/ml, sendo os valores de transfecção mais elevados e, significativamente diferentes dos obtidos para a densidade celular de $4x10^4$. Além do mais, os complexos preparados numa razão de carga de 2/1 (lípido catiónico / DNA) atingem valores mais elevados de actividade.

5. EFEITO DO TIPO DE LÍPIDO E DA RAZÃO DE CARGA (LÍPIDO/DNA) NA ACTIVIDADE DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63, MC3T3-E1 E 293T

A actividade de transfecção foi determinada para duas formulações de lipossomas constituídos por Dotap/Dope (1:1) e Dotap/Colesterol (1:1). Cada formulação foi testada nas razões de carga (Lípido catiónico/DNA) de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1 e 4/1. Foi utilizado 1μg de DNA para todas as razões de carga, variando-se a quantidade de lípido para obter a razão desejada. A fim de

optimizar o sistema, determinou-se a actividade de transfecção com complexos ternários (Tf), com adição de 32 μg de transferrina/ μg de DNA aos complexos binários, como descrito nos materiais e métodos. Tendo em conta os resultados do estudo efectuado com os complexos binários, para determinação da melhor densidade celular a utilizar, apenas foi associada transferrina para os complexos com razão de carga de 1/1, 3/2 e 2/1.

Foi efectuada uma comparação entre a actividade obtida com os complexos preparados no nosso laboratório e um reagente de transfecção comercial – Lipofectamina®.

O plasmídio utilizado neste estudo foi o pCMV*lacZ* que codifica a enzima β-galactosidase. Esta enzima catalisa a hidrólise do orto-nitrofenil-β-D-galactosídeo (ONPG) convertendo-o em galactose e orto-nitrofenol. O orto-nitrofenol é um composto de coloração amarela, cuja absorvância foi medida a 420nm. Os valores obtidos foram expressos em μg de enzima, por extrapolação a partir da recta padrão da β-gal, e normalizados pelo valor da proteína total. Uma vez que as células podem apresentar actividade endógena de β-galactosidase, a absorvância obtida na células não transfectadas foi subtraída às amostras transfectadas.

As células da linha MG-63 e MC3T3-E1 são osteoblásticas, provenientes de um osteosarcoma humano e do calvário de ratinhos, respectivamente. As células da linha 293T, proveniente de células embrionárias de rim humano, foram utilizadas como controlo positivo do trabalho uma vez que possuem características que as torna mais facilmente transfectáveis.

A figura 19 diz respeito ao efeito da razão de carga (+/-) na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase utilizando a formulação DOTAP-DOPE na razão 1:1, em células MG-63 e MC3T3-E1.

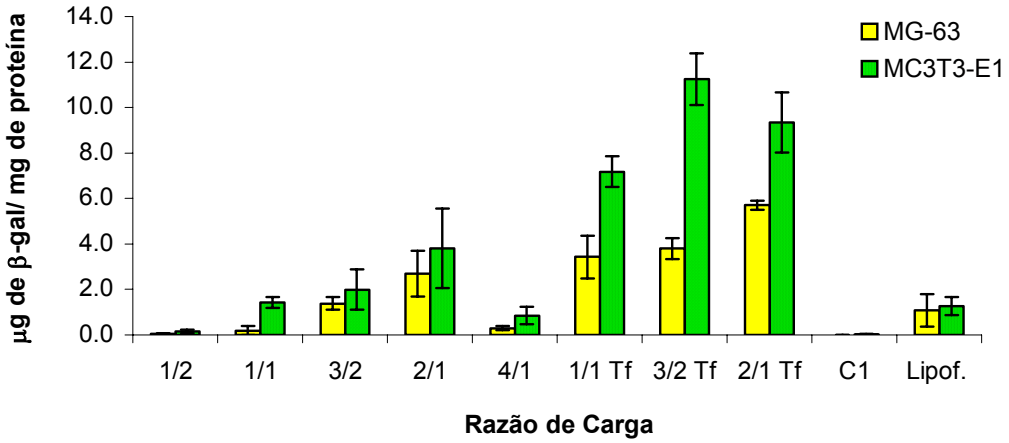


Figura 19 - Efeito da razão de carga (+/-) na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase utilizando a formulação DOTAP-DOPE na razão 1:1, em células MG-63 e MC3T3-E1. Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 - células tratadas apenas com 1μg de DNA; Lipof. – células transfectadas com lipofectamina. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas e são representativos de três experiências.

De acordo com os dados indicados na figura 19 para a formulação DOTAP-DOPE (1:1), a actividade de transfecção das células MC3T3-E1 é significativamente superior à apresentada pelas células MG-63 na razão de carga de 1/1 e, no caso dos complexos ternários, isto é, associados à transferrina, em todas as razões de carga. Nas células da linha MC3T3-E1, verifica-se um aumento significativo da transfecção com os complexos ternários comparativamente com os complexos binários preparados na mesma razão de carga, o que indica que a transferrina poderá ter um papel importante na transfecção para estas células. No caso da linha celular MG-63, só há diferenças significativas entre os complexos binários e ternários na razão de carga de 2/1. Tanto para as células da linha MC3T3-E1 como para as da linha MG-63, os complexos que apresentam valores de actividade mais elevada são os preparados na razão 2/1, tanto para os complexos binários, como para os ternários. É de notar que a Lipofectamina apresenta actividade de transfecção para estas linhas celulares, da ordem de grandeza obtida pelos complexos binários, sendo por isso, significativamente inferior à obtida nos complexos associados à transferrina.

Testou-se igualmente a actividade de transfecção com complexos preparados a partir de uma formulação DOTAP-Colesterol de forma a determinar a influência da composição lipídica na transfecção.

Na figura 20 pode-se observar os valores obtidos para a actividade de transfecção das células MG-63 e MC3T3-E1 em complexos preparados a partir de DOTAP-Colesterol (1:1). Verifica-se neste caso que a transfecção nas células MC3T3-E1, foi significantemente superior para as razões de carga 3/2, 2/1, 4/1, 3/2 Tf e 2/1 Tf.

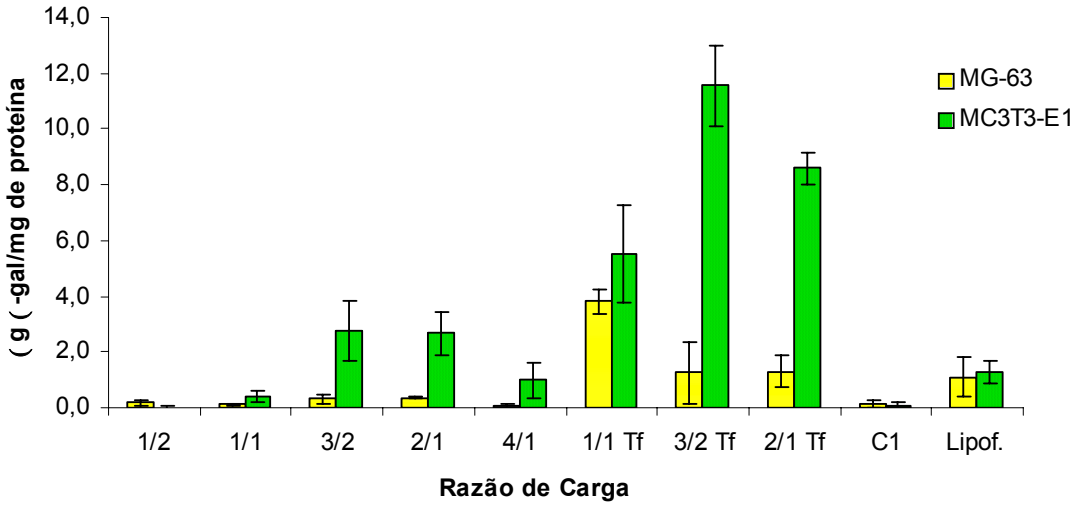


Figura 20 - Efeito da razão de carga (+/-) na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase utilizando a formulação DOTAP-Colesterol na razão 1:1, em células MG-63 e MC3T3-E1. Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA; Lipof. – células transfectadas com lipofectamina. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas e são representativos de três experiências.

Relativamente às células da linha MC3T3-E1 não existem diferenças significativas entre as razões de carga de 3/2 e 2/1, sendo no entanto estes valores, significativamente diferentes e superiores dos obtidos para as razões 1/2, 1/1 e 4/1. No caso dos complexos associados à transferrina e, ainda para as mesmas células, a melhor razão de carga é a de 3/2 Tf, sendo que as três razões testadas diferem entre si.

Em relação às células da linha MG-63, no caso dos complexos binários, para todas as razões de carga, a transfecção é muito baixa, não havendo diferenças entre si. A melhor razão de carga, e única significativamente diferente de todas as outras razões de carga testadas, é a de 1/1 com transferrina. Este facto demonstra a importância de se conhecer a razão de carga ideal para cada tipo de célula, com cada formulação lipídica a fim de melhorar o sistema.

Ainda relativamente à figura 20, em que os complexos foram preparados com DOTAP-Colesterol (1:1), os valores obtidos nas transfecções com Lipofectamina são significantemente superiores aos complexos binários em todas as razões de carga para as células da linha MG-63; no entanto, continua a ser menor do que a obtida pelos complexos preparados na razão de 1/1 e associados à transferrina. Em relação às células da linha MC3T3-E1, a actividade obtida pela transfecção com os complexos de razão de carga de 2/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf são significativamente superiores às obtidas com Lipofectamina.

A figura 21 compara os resultados obtidos para a actividade de transfecção das células MG-63 com as duas formulações de lípidos testadas: DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1).

É possível verificar, com excepção das razões de carga de 1/2, 1/1, 4/1 e 1/1 Tf, a actividade de transfecção com DOTAP-DOPE é significantemente superior à actividade com DOTAP-Colesterol. No caso das razões dos complexos preparados nestas razões de carga (1/2, 1/1, 4/1 e 1/1 Tf), não existem diferenças significativas entre os valores obtidos na transfecção com cada uma das formulações lipídicas.

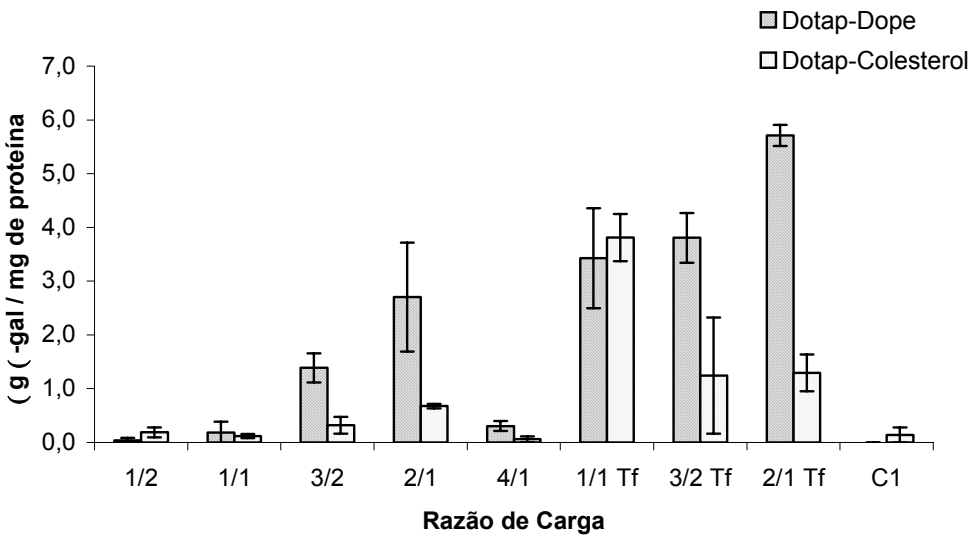


Figura 21 - Efeito da composição lipídica e da razão de carga (+/-) dos complexos na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase em células MG-63, utilizando a formulação DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas e são representativos de três experiências.

A comparação entre a actividade de transfecção obtida pelas duas formulações de lípidos (DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol) em células MC3T3-E1 pode ser observada na figura 22. No caso desta linha celular, para as razões de carga consideradas, não existem diferenças significativas entre a actividade obtida com cada formulação, sendo que a maior actividade foi conseguida para a razão de carga 3/2 com transferrina, nos dois casos.

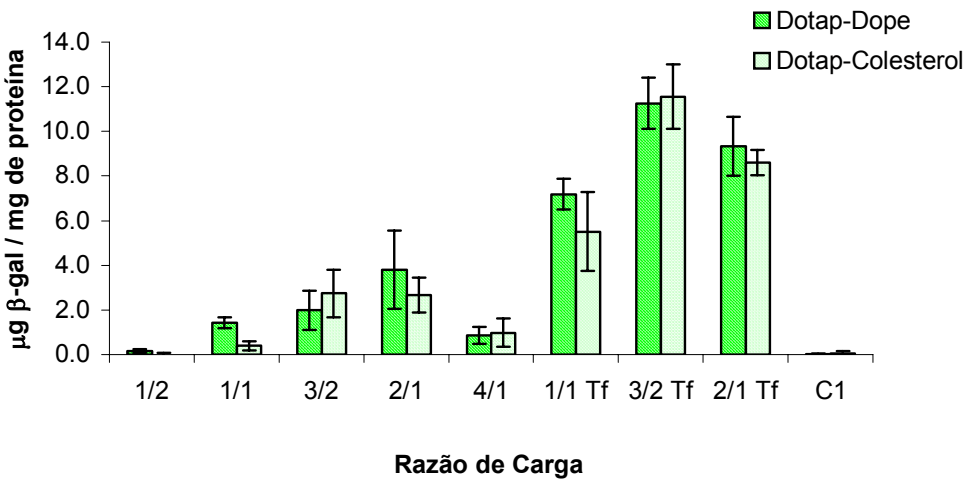


Figura 22 - Efeito da composição lipídica e da razão de carga (+/-) dos complexos na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase em células MC3T3-E1 utilizando a formulação DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1μg de DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos três réplicas e são representativos de três experiências.

Como foi referido inicialmente, a linha celular 293T foi utilizada nos estudos de transfecção como controlo positivo a fim de testar a eficiência dos complexos preparados no nosso laboratório e a dependência existente entre a actividade de transfecção e o tipo de células. Foram testadas as mesmas composições lipídicas (DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol) para as razões de carga (+/-) de 1/2, 1/1, 3/2, 2/1, 4/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf. Os valores obtidos estão representados na figura 23, e, como é facilmente observável, os níveis de transfecção são cerca de 100 vezes superiores aos obtidos para as células da linha MC3T3-E1 na razão de carga de 2/1 Tf. Contrariamente às células osteoblásticas, a actividade de transfecção com DOTAP-Colesterol nestas células, é significativamente superior para todas as razões de cargas testadas, excepto a razão 1/2, 2/1, 4/1 e 2/1 Tf. Na razão 1/2 Tf os valores obtidos para DOTAP-Colesterol são mais elevados do que para DOTAP-DOPE, apesar de não serem estatisticamente significativos.

É de notar que o papel da transferrina como potenciador da transfecção na linha 293T não se faz notar nos complexos com razão de carga 3/2 Tf.

A Lipofectamina, à semelhança dos lipossomas preparados no nosso laboratório, apresenta uma taxa de transfecção muito mais elevada nesta linha celular, contudo, inferior à maioria dos nossos complexos, como é visível no gráfico 23.

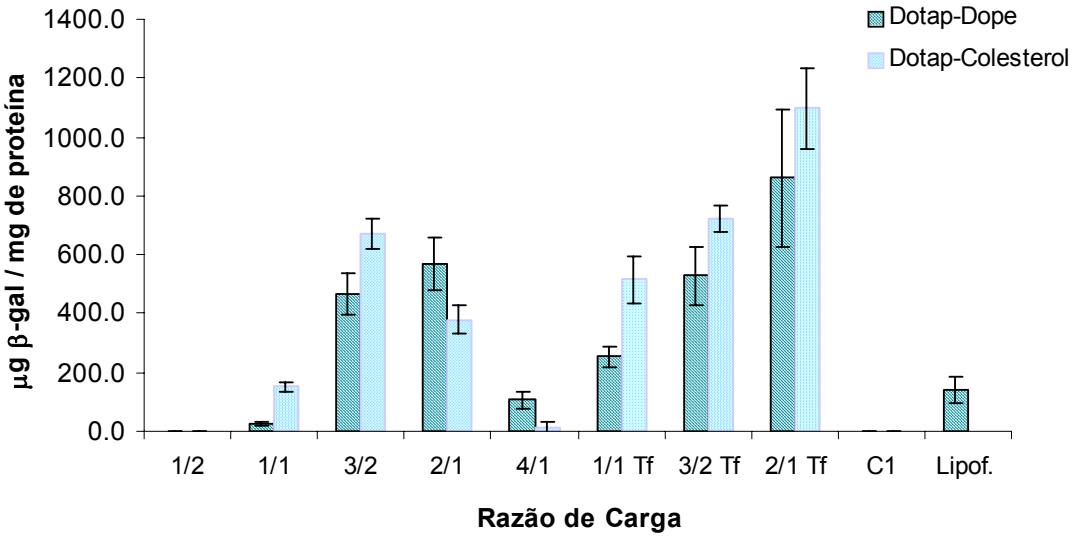


Figura 23 - Efeito da composição lipídica e da razão de carga (+/-) dos complexos na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase em células 293T, utilizando a formulação DOTAP-DOPE (1:1) e DOTAP-Colesterol (1:1). Tf – complexos com 32 µg de transferrina/µg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com 1µg de DNA; Lipof. – células transfectadas com lipofectamina. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas e são representativos de três experiências.

6. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE DNA NA ACTIVIDADE DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63 E MC3T3-E1

Como já foi referido, são muitos os parâmetros que afectam a eficiência de transfecção. Um deles está relacionado com a dose de DNA que é administrada às células no processo de transfecção. A fim de estudar a influência da quantidade de DNA na transfecção das células de linhas osteoblásticas, as células MG-63 e MC3T3-E1 foram transfectadas com complexos contendo 1, 2 e 4 μg de DNA. O volume do lípido foi ajustado de modo a obter as razões de carga entre lípido catiónico-DNA (+/-) de 1/1, 3/2, 2/1, 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1Tf. Os gráficos 24 e 25 dizem respeito ao estudo deste parâmetro.

A figura 24 mostra os resultados obtidos no estudo da influência da quantidade de DNA na actividade de transfecção das células MG-63. Para cada razão de carga, os valores obtidos utilizando 1 μg de DNA são significativamente menores dos valores obtidos quando se utilizou 2 e 4 μg de DNA, o que demonstra que um aumento da quantidade de DNA leva claramente a um aumento da actividade de transfecção. Comparando a transfecção obtida com 2 e 4 μg de DNA, verifica-se que só existem diferenças significativas na razão de carga 2/1 Tf, sendo esta a melhor razão de carga para as três doses de DNA testadas, e, o valor obtido com 4 μg de DNA, significantemente superior.

Relativamente ao controlo, ou seja, células transfectadas apenas com DNA, verifica-se um aumento da transfecção utilizando 2 e 4 μg de DNA, atingindo-se valores da ordem dos obtidos nas transfecções utilizando complexos com 1 μg de DNA.

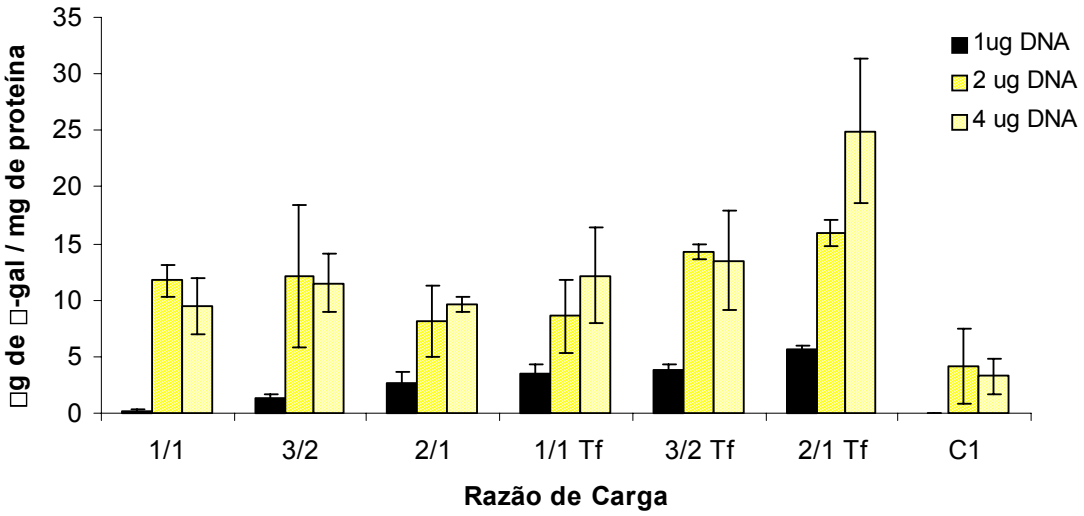


Figura 24 – Influência da quantidade de DNA na actividade de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase em células MG-63, utilizando a formulação DOTAP-DOPE (1:1). Tf – complexos com 32 μg de transferrina/μg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

No estudo da influência da quantidade de DNA utilizando as células MC3T3-E1, (figura 25) verifica-se também que os complexos preparados com 2 e 4 μg de DNA apresentam uma actividade de transfecção mais elevada do que os preparados com 1 μg de DNA. No entanto, nesta linha celular, relativamente ao controlo (células transfectadas apenas com DNA), obtemos valores de actividade mais elevados com os complexos ternários e 1 μg de DNA.

Tendo em conta os valores obtidos com 2 e 4 μg de DNA para esta linha celular (MC3T3-E1), apenas se verificam diferenças significativas para a razão de carga 2/1 Tf, sendo que os valores mais elevados de transfecção acontecem quando se utiliza 2 μg de DNA. Esta tendência verifica-se igualmente para todas as outras razões de carga (apesar de não haver diferenças significativas).

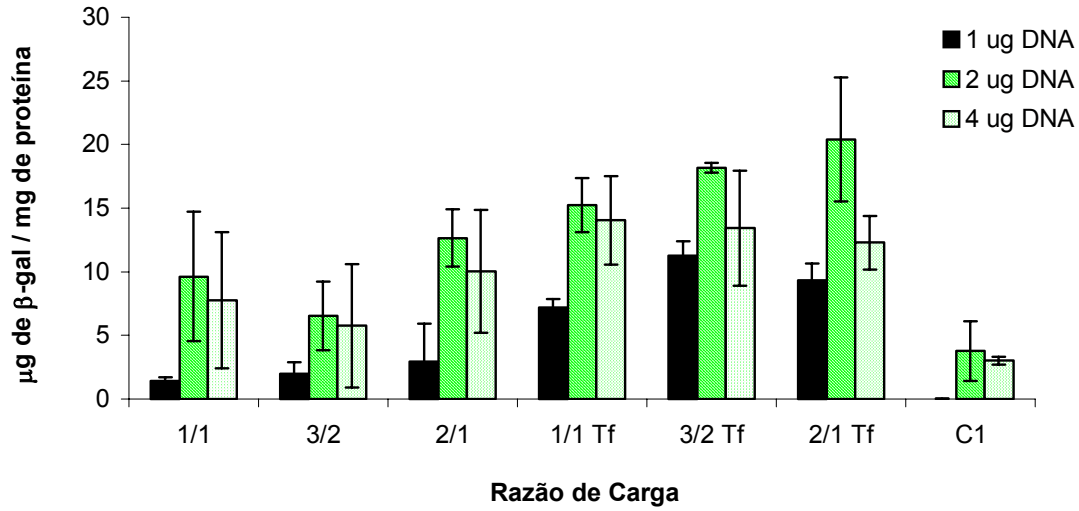
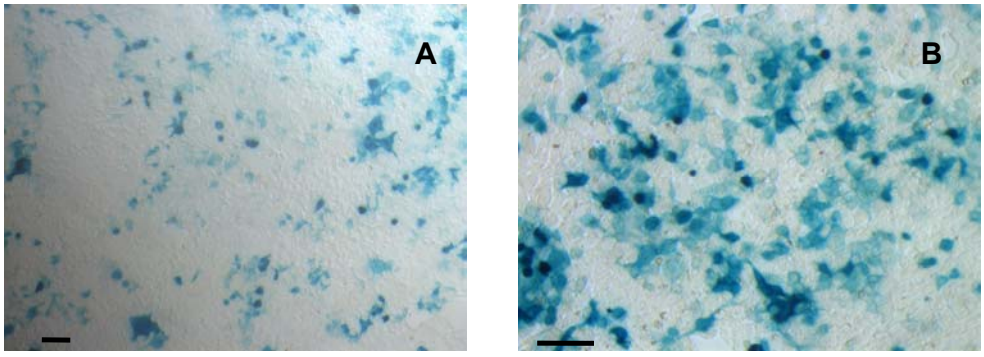


Figura 25 – Influência da quantidade de DNA na taxa de transfecção e expressão do gene da β-galactosidase em células MC3T3-E1, utilizando a formulação DOTAP-DOPE (1:1). Tf – complexos com 32 µg de transferrina/µg de DNA ; C1 – células tratadas apenas com DNA. A Média ± o Desvio Padrão foram obtidos a partir de três réplicas.

7. EFEITO DO TIPO DE LÍPIDO E DA RAZÃO DE CARGA (LÍPIDO/DNA) NA EFICIÊNCIA DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS MG-63, MC3T3-E1 E 293T

As células eficazmente transfectadas com o gene da β-gal podem ser identificadas pela incubação com o substrato X-Gal. A degradação deste substrato produz uma coloração azul que permite a sua visualização ao microscópio.

A eficiência de transfecção é avaliada pela percentagem de células que expressam a β-Galactosidase, isto é, que desenvolvem a cor azul. No entanto, no caso do estudo em questão, devido à elevada densidade celular ao fim de 48 horas após a transfecção, a contagem do número de células tornou-se inviável. Assim são apresentadas abaixo as imagens de *staining* para as células MG-63, MC3T3-E1 e 293T, nas razões de carga de 1/1 Tf, 3/2 Tf e 2/1 Tf, fazendo-se uma análise qualitativa das mesmas.



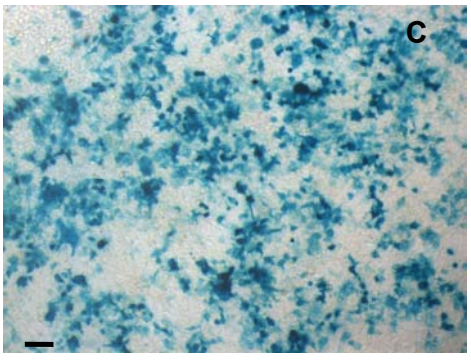


Figura 26 (A-C) – Imagens relativas à eficiência de transfecção do gene da β-galactosidase em células da linha 293T, com a formulação DOTAP-Colesterol (1:1), associados à transferrina. A – razão de carga (+/-) 1/1 Tf; B – razão de carga 3/2 Tf; C – razão de carga 2/1 Tf. Barra = 50 μm.

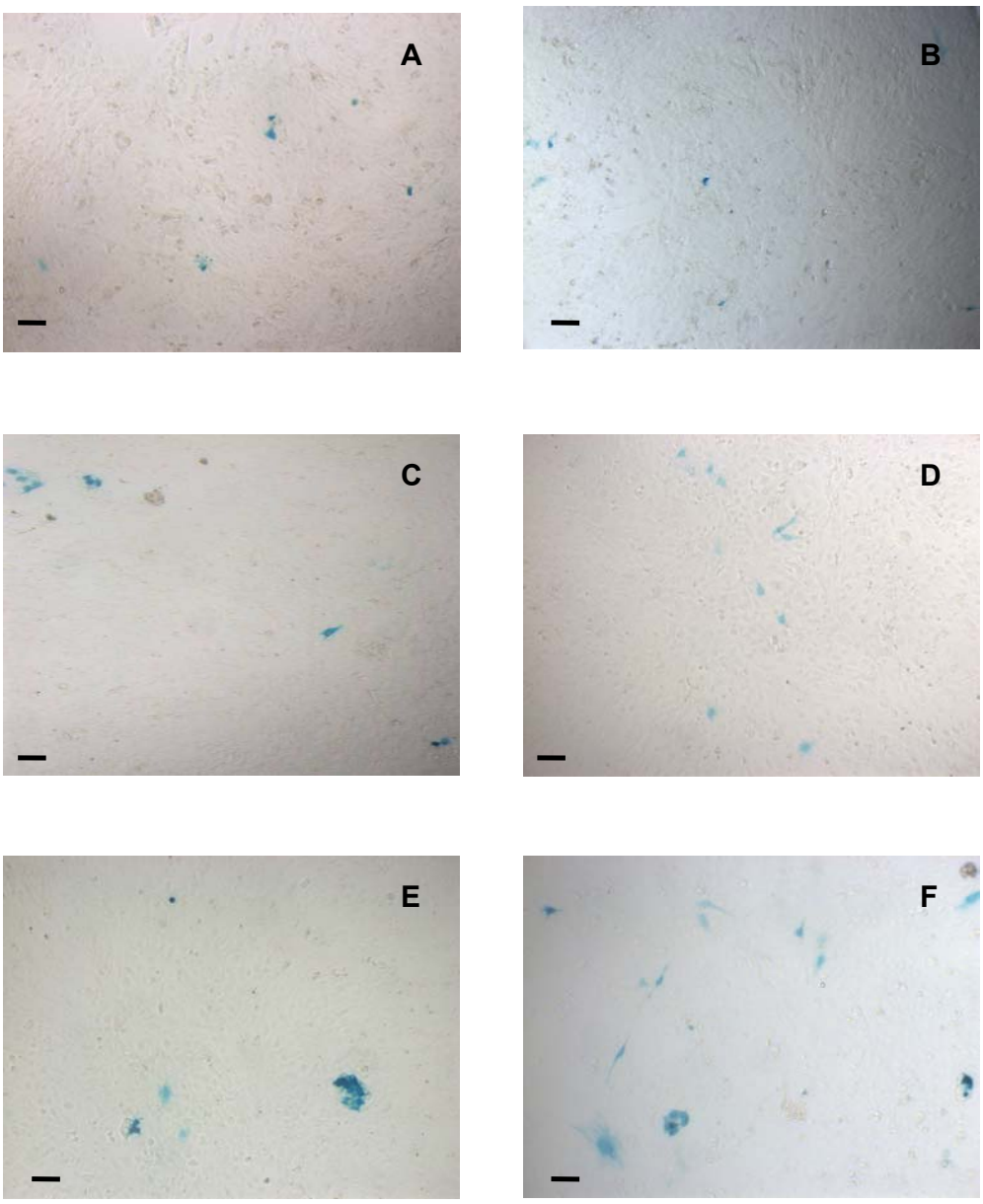


Figura 27 (A-F) – Imagens relativas à eficiência de transfecção do gene da β-galactosidase em células da linha MG-63 (A-C) e MC3T3-E1 (D-F), com a formulação DOTAP-DOPE, associados à transferrina. A e D – razão de carga (+/-) 1/1 Tf; B e E – razão de carga 3/2 Tf; C e F – razão de carga 2/1 Tf. Barra = 50 μm.

É visível pelas imagens de *staining,* que a eficiência de transfecção nas células 293T é muito superior à ocorrida nas células MG-63 e MC3T3-E1. Por sua vez, também é notório, principalmente na razão de carga 2/1 Tf, que a eficiência de transfecção é superior nas células MC3T3-E1, relativamente às MG-63. Verificou-se que a morfologia das células transfectadas não se alterou em comparação com as células controlo (não transfectadas), apresentando-se bem espalhadas e aderentes.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A reparação de fracturas e de defeitos no osso é alvo de terapias cujas limitações são reconhecidas. Assim, a terapia génica poderá ser uma alternativa para a libertação de factores que estimulem a osteogénese. O objectivo deste trabalho foi, portanto, avaliar em que medida os lipossomas catiónicos constituem uma estratégia viável como vectores para terapia génica em células do tecido ósseo. Com este fim, realizaram-se ensaios de forma a avaliar a actividade de transfecção em duas linhas celulares osteoblásticas (MG-63 e MC3T3-E1), utilizando como controlo células embrionárias de rim humanas (linha celular 293T). A actividade de transfecção foi avaliada quantitativa e qualitativamente, fazendo variar a razão de carga dos complexos, a formulação lipídica e a associação de um ligando, a transferrina. Para além da actividade e eficiência de transfecção, foi também avaliada a citotoxicidade dos complexos, tamanho, potencial zeta e o seu efeito protector relativamente à degradação do DNA mediada pelas nucleases.

As interacções electrostáticas entre o DNA e os lipossomas têm um impacto significativo tanto nas propriedades físico-químicas dos complexos como na sua actividade biológica. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os complexos preparados na razão de carga 1/2 (lípido catiónico/DNA), apresentam valores de potencial zeta negativos, o que significa que existe um excesso de DNA não complexado e exposto, contribuindo assim, para a carga global negativa apresentada pelos complexos. O aumento da quantidade de lípido catiónico leva a um aumento do valor de potencial zeta. O valor máximo foi atingido nos complexos preparados na razão de carga 4/1, onde o excesso de lípido catiónico foi capaz de neutralizar praticamente todas as cargas negativas, uma vez que apresentam valores de potencial zeta muito próximos dos obtidos para os lipossomas livres. A transferrina tem carga global negativa, o que torna os complexos ternários mais negativos que os complexos binários, na mesma razão de carga.

A interacção entre o DNA e os lipossomas é de natureza electrostática, entre os grupos fosfato do DNA, carregados negativamente, e as cargas positivas do lípido catiónico Dotap. Os co-lípidos utilizados neste trabalho (Dope e Colesterol) são neutros. Contudo, de acordo com o descrito por Hirsch-Lerner e colaboradores (Hirsch-Lerner, Zhang et al. 2005), quando Dope está presente nos lipossomas catiónicos ou nos complexos, diminui a carga positiva dos complexos. Isto acontece devido a uma parcial neutralização dos iões quaternários de amónia do Dotap, e da carga negativa do Dope, apesar da possível interacção do grupo amina do Dope com os grupos fosfato do DNA. Contrariamente ao Dope, o Colesterol não possui nenhum grupo ionogénico. O seu grupo OH-β em C3 introduz apenas uma polaridade mínima. A presença do colesterol nos lipossomas catiónicos, ou não afecta, ou aumenta ligeiramente a carga superficial. Essa presença causa uma desidratação significativa na bicamada de lípido catiónico, tornando assim a carga catiónica mais exposta (Hirsch-Lerner, Zhang et al. 2005). Os resultados obtidos nos nossos estudos estão de acordo com a teoria descrita, uma vez que os complexos constituídos por DOTAP-Colesterol apresentam valores mais positivos de potencial zeta, do que os constituídos por DOTAP-DOPE. A única excepção acontece no caso dos complexos que apresentam valores de potencial zeta negativo (razão 1/2), em que os complexos com DOTAP-Colesterol são mais negativos. Esse facto pode ser devido a uma ineficiente formação dos complexos nesta razão de carga.

A determinação do tamanhos dos complexos é um parâmetro crítico que comanda em grande parte a via de internalização e a actividade biológica dos complexos. A determinação desse parâmetro foi, portanto, de grande importância para este trabalho.

O tamanho das partículas aumenta quando complexadas com o DNA. Apesar disso, verifica-se que os complexos que exibem carga superficial positiva ou negativa são menores do que aqueles que rondam a neutralidade (1/1). Este facto deve-se às forças electrostáticas repulsivas que evitam a sua agregação. Nos complexos preparados na razão de carga 1/1 essas forças fazem-se sentir com muito menor intensidade provocando sua agregação e, consecutivamente,

o aumento do tamanho das partículas. Os resultados obtidos para o índice de polidispersão também estão de acordo com esses dados, dando indicação que a população dos complexos preparados na razão de carga 1/1, é uma população heterogénea, isto é, formada por agregados de complexos e complexos isolados.

A associação da transferrina aumenta significativamente o tamanho dos complexos. Para além de ser mais um elemento incorporado aos complexos, a sua carga negativa contribui, possivelmente para uma menor condensação do DNA.

É reconhecido por muitos autores que um dos meios de aumentar a eficiência de transfecção é promover uma maior protecção do DNA pelos complexos a fim de evitar a sua degradação pelas DNases. De acordo com os resultados obtidos para a razão de carga 1/2, cerca de 80% do DNA não está protegido, o que está de acordo com os dados obtidos na medição do potencial zeta, que revelam valores negativos para estes complexos. Para as outras razões de carga, apesar da percentagem do DNA protegido aumentar com o aumento da razão lípido-DNA, como esperado, a percentagem de DNA protegido é relativamente baixa, obtendo-se um máximo de protecção nos complexos preparados na razão de carga 4/1 (+/). É importante referir que ao valor mais alto de protecção, não corresponde uma maior actividade ou eficiência de transfecção. Isto pode ser devido à dificuldade de dissociação do complexo, impedindo a libertação do DNA, ou ao efeito de citotoxicidade. A composição lipídica, no caso dos lipossomas utilizados (DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol), não parece exercer um papel fundamental na capacidade de protecção do DNA, apesar da percentagem de DNA protegido ser sempre ligeiramente superior com a formulação DOTAP-DOPE.

Apesar de alguns estudos concluírem que a associação da transferrina pode aumentar a protecção do DNA pelos complexos (Tros de Ilarduya, Arangoa et al. 2002), esse efeito não se verifica no caso dos complexos ternários testados, havendo uma diminuição da protecção do DNA pelos complexos ternários comparativamente com os binários para as mesmas razões de carga.

Está descrito que, em elevadas doses, os lipossomas catiónicos podem aumentar a eficácia de transfecção. No entanto podem também ser responsáveis por efeitos citotóxicos. Assim, para além da eficiência de transfecção, também a citotoxicidade deve ser tida em conta no desenvolvimento de protocolos de transfecção. Tecnicamente, quando o número de células é limitado e há a necessidade de preservá-las, a sobrevivência celular pode ser um parâmetro crítico a ter em conta (Kim, Ogawa et al. 2004). Dependendo da aplicação, deve-se dar prioridade à eficiência, à citotoxicidade ou ponderar entre estes dois parâmetros. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados nas células MG-63, MC3T3-E1 e 293T, só havendo efeito citotóxico na razão de carga 4/1, para todas as células e nas duas formulações lipídicas testadas. A partir desta quantidade de lípido, é necessário fazer um balanço entre os resultados obtidos para a actividade de transfecção e a citotoxicidade, visto que há um aumento significativo do efeito tóxico para as células. É possível concluir também neste ensaio que não há um efeito citotóxico associado a um tipo de formulação lipídica, tendo em conta as duas alternativas testadas (DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol).

Apesar de terem sido publicados muitos estudos relacionados com a utilização dos lipossomas catiónicos como vectores para terapia génica, a realidade é que as características estruturais, o processo de internalização dos complexos e transporte intracelular, bem como a relação entre esses mecanismos ainda não está bem compreendida. Já foi discutido que a alteração na razão de carga e na formulação lipídica dos complexos têm efeitos significativos nas características físico-químicas dos complexos. Sabe-se no entanto, que os lipoplexos apresentam comportamentos diferentes dependendo do tipo de células em estudo, o que se reflecte na actividade e eficiência de transfecção (Duzgunes, Simões et al. 2001) De acordo com o objectivo do trabalho, foi avaliada a actividade e a eficiência de transfecção dos complexos catiónicos lipossoma-DNA em células do tecido ósseo (MG-63 e MC3T3-E1) e numa linha de rim humano (293T) como controlo positivo dos ensaios efectuados.

As células da linha MG-63 são provenientes de um osteosarcoma humano, sendo amplamente utilizadas em estudos de biocompatibilidade *in vitro*. Nas células da linha MG-63, a expressão de uma variedade de citoquinas, factores

de crescimento e seus receptores têm sido descritos como semelhantes aos existentes nos osteoblastos normais humanos. No entanto, a expressão génica alterada, responsável pelo fenótipo tumoral, pode atenuar ou aumentar alguns fenómenos celulares não reflectindo o que se passa com osteoblastos primários (Torricelli, Fini et al. 2003). Por esse motivo os mesmos estudos de transfecção foram feitos em outra linha celular, MC3T3-E1, provenientes de ratinhos, e vulgarmente utilizadas em testes *in vitro* como modelos de células osteoblásticas.

Nas três linhas celulares estudadas foi observada transfecção com os lipossomas desenvolvidos, uma vez que obtivemos valores significativamente diferentes dos controlos onde as células foram transfectadas com DNA livre. No entanto, verifica-se o pressuposto de que o tipo de célula é um factor a ter em conta na utilização dos lipossomas como vectores. O controlo positivo foi feito utilizando as células 293T, demonstrando deste modo, que os lipossomas catiónicos produzidos neste trabalho são internalizados pelas células e levam à expressão de β-galactosidase. Para além disso, para todas as razões de carga, obtivemos valores de transfecção significativamente mais elevados do que utilizando DNA livre ou Lipofectamina®. As células MG-63 e MC3T3-E1, não apresentam actividade de transfecção da mesma grandeza, sendo significativamente inferior. Isso pode ser resultado da deficiente internalização dos complexos pela célula ou, o DNA depois de internalizado, poderá não estar a ser expresso, nomeadamente devido à sua degradação por endonucleases. Estudos que utilizaram como vectores nanopartículas de quitosano para terapia génica em células MG-63 demonstraram que as partículas permanecem à superfície das células pelo menos durante uma semana após o período de incubação (Corsi, Chellat et al. 2003). A composição da membrana celular varia com os vários tipos de células, podendo facilitar ou não a ligação dos complexos à sua superfície ou sua internalização. É reconhecido que uma síntese deficiente de proteoglicanos pode dificultar a transfecção mediada por lipossomas (Mislick and Baldeschwieler 1996).

As células da linha MC3T3-E1 apresentam maior actividade de transfecção do que as MG-63 em todas as razões de carga testadas e nas duas formulações

lipídicas. Esses resultados não foram os esperados tendo em conta que as células tumorais se dividem mais rapidamente, e caracteristicamente possuem um número mais elevado de receptores para a transferrina nas suas membranas. Nas células MC3T3-E1, a associação da transferrina aos complexos leva a um aumento significativo da actividade e da eficiência de transfecção, possivelmente devido a uma maior capacidade de internalização dos complexos, dada a capacidade do ligando de promover o processo de endocitose. No caso das células MG-63, o efeito da transferrina apenas é notado na razão de carga 2/1 (formulação DOTAP-DOPE), e nos complexos preparados a partir de DOTAP-Colesterol. No entanto, para estes últimos, os valores de transfecção dos complexos binários são muito baixos. Os receptores de transferrina das células MG-63 poderão estar de algum modo alterados, não promovendo assim a internalização dos complexos.

O aumento da transfecção dos complexos associados à transferrina é observado tanto para a formulação DOTAP-DOPE como DOTAP-Colesterol, o que indica que não é um efeito específico para uma determinada formulação lipídica.

Como referido no início desta discussão, a associação de transferrina aos complexos leva a um aumento do tamanho das partículas. Muitos autores admitem que os menores complexos são responsáveis por uma maior eficiência de internalização . No entanto, é reconhecido por outros autores que os complexos com maiores tamanhos são mais efectivos devido a estes depositarem-se mais facilmente sobre na superfície das células (Simões, Filipe et al. 2005). Neste caso, o aumento do tamanho não será relevante, ou, o efeito da conjugação de um ligando específico será preponderante uma vez que, para os complexos binários, o aumento de tamanho não se traduz no aumento da actividade de transfecção.

É importante verificar que a actividade de transfecção varia com o tipo de célula, a razão de carga dos complexos, a formulação lipídica, e com a interacção destes três factores, ou seja, não temos uma razão de carga nem uma formulação lipídica ideal para os osteoblastos. É um facto que obtivemos valores mais elevados de transfecção nas células MG-63, com a formulação

DOTAP-DOPE, associados à transferrina e com a razão de carga 2/1; no caso das MC3T3-E1, o valor mais elevado de transfecção foi obtido na razão de carga 3/2, em complexos associados à transferrina preparados a partir de DOTAP-Colesterol. Assim sendo, a razão de carga ideal depende da formulação lipídica utilizada e do tipo de células em estudo. Nas células MG-63, nas razões de carga onde a actividade de transfecção foi mais elevada, não se registaram diferenças significativas entre DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol, o que demonstra que o efeito dos lípidos em estudo na transfecção destas células é nulo. No caso das células MG-63, a formulação DOTAP-DOPE domina positivamente, com excepção de uma razão de carga (1/1 Tf). As diferenças de actividade não podem ser explicadas por diferenças na citotoxicidade, uma vez não se verificam diferenças significativas de toxicidade nas células excepto na razão de carga 4/1.

Aumentando as doses de DNA para 2 e 4 μg, verifica-se que a actividade de transfecção das MG-63 duplica e, em alguns casos triplica. Esse aumento de actividade pode ser explicado por uma maior entrada de DNA na célula e consequente expressão. No caso das MC3T3-E1, esses resultados não se confirmam, sendo que as taxas de transfecção mais elevadas são obtidas com 2 μg de DNA. Poderá haver uma saturação dos receptores, ou então ser mais notório o efeito da citotoxicidade. Isto porque, na preparação dos complexos aumentou-se a quantidade de DNA e consecutivamente a quantidade de lipossomas catiónicos a fim de manter as razões de carga. Logo, os complexos preparados na razão de carga 2/1, com 4 μg de DNA, contém um volume de lipossomas quatro vezes superior aos preparados com 1 μg. Especulando a partir dos resultados obtidos para a citotoxicidade, essa concentração de lípido catiónico provavelmente é tóxica para as células.

Tendo em conta os resultados de eficiência de transfecção (quantidade de células transfectadas), é notório que um aumento da actividade de transfecção, corresponde um aumento na eficiência, apesar de não ser possível saber se essa correspondência é proporcional.

CONCLUSÃO

A terapia génica é uma abordagem promissora de tratamento das patologias que afectam o osso. Os lipossomas catiónicos são uma alternativa aos vectores virais uma vez que são seguros, simples na preparação e utilização, podem ser modificados de forma a aumentar a sua taxa de internalização, e estão associados a uma expressão transiente, adequada no tratamento de algumas patologias do osso e reparação de fracturas.

Neste trabalho foi avaliado em que medida os lipossomas catiónicos constituem uma abordagem como vectores para terapia génica em osteoblastos. Os lipoplexos preparados com DOTAP-DOPE e DOTAP-Colesterol, em diferentes razões de carga (lípido catiónico-DNA), com ou sem transferrina, foram caracterizados quanto ao potencial zeta, tamanho e capacidade de protecção do DNA. O aumento da quantidade de lípido em relação ao DNA conduz a um aumento do potencial zeta, sendo os complexos preparados com DOTAP-Colesterol mais positivos que os preparados com DOTAP-DOPE. O Tamanho dos complexos binários ronda em média os 300 nm, com excepção da razão 1/1, onde a ausência de forças repulsivas leva a uma agregação dos complexos e um consequente aumento do tamanho. A transferrina aumenta de forma significativa o tamanho dos complexos. A capacidade de protecção do DNA pelos complexos aumenta com o aumento da quantidade de lípido em relação ao DNA. O aumento de lípido leva a uma condensação mais eficaz do DNA, diminuindo à sua exposição as DNases.

A eficácia e a eficiência de transfecção *in vitro* foi avaliada em osteoblastos da linha MG-63 e MC3T3-E1, utilizando a linha 293T como controlo positivo, onde se demonstrou que os nossos complexos tinham a capacidade de promover elevados níveis de transfecção. Através destes estudos foi possível demonstrar uma elevada dependência relativamente ao tipo de células e à razão de carga (lípido-DNA), sendo que as células da linha MC3T3-E1 apresentam níveis de transfecção mais elevados. A associação de transferrina aos complexos como promotor da endocitose aumentou significativamente a transfecção nas células

da linha MC3T3-E1 e 293T, sendo este efeito pouco notório nas células da linha MG-63. A actividade de transfecção é também dependente da dose de DNA aplicada, que idealmente, varia com o tipo de célula. Os estudos relativos à viabilidade celular confirmaram que os lipossomas apenas são responsáveis por citotoxicidade a partir de determinadas concentrações.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem assim concluir que, os lipossomas são uma abordagem a considerar como vectores não virais para terapia génica em osteoblastos. A associação de transferrina permitiu uma melhoria considerável do sistema; seria interessante associar outros ligandos aos complexos, continuando desta forma, a melhoria deste sistema de transfecção para osteoblastos.

BIBLIOGRAFIA

V. Winden and A., E. C. (2003). Freeze-Drying of Liposomes: Theory and Practice

Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 99-110.

Alan L. Parker, Christopher Newman, et al. (2003). "Lipoplex-mediated transfection and endocytosis." Expert Reviews in Molecular Medicine **Vol. 5**.

Bally, M. B., P. Harvie, et al. (1999). "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." Advanced Drug Delivery reviews **38**(3): 291-315.

Baylink, D. J., D. D. Strong, et al. (1999). "The diagnosis and treatment of osteoporosis: future prospects." Molecular medicine Today: 133-140.

Bucholz, R. (2002). "Nonallograft osteoconductive bone grafts substitutes." Clinical Orthopedic **395**: 44-52.

Carriere, M., I. Tranchant, et al. (2002). "Optimization of cationic lipid mediated gene transfer: structure-function, physico-chemical, and cellular studies." J Liposome Res **12**(1-2): 95-106.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **Vol. 422**: 37-44.

Corsi, K., F. Chellat, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles." Biomaterials **24**(7): 1255-1264.

Dragoo, J. L., J. Y. Choi, et al. (2003). "Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat." Journal of orthopaedic research **21**(4): 622-629.

Duzgunes, N. (2003). Preparation and Quantitation of Small Unilamellar Liposomes and Large Unilamellar Reverse-Phase Evaporation Liposomes
Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 23-27.

Duzgunes, N. and S. Nir (1999). "Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions." Advanced Drug Delivery reviews **40**(1-2): 3-18.

Duzgunes, N., S. Simões, et al. (2001). Gene Delivery by Cationic Liposome-DNA Complexes. Polymeric Biomaterials. S. Dumitriu. Quebec, Marcel Dekker, Inc.**:** 943-957.

Eliyahu, H., Y. Barenholz, et al. (2005). "Polymers for DNA Delivery." Molecules **10**: 34-64.

Garcia, E. S. and C. I. Chamas (1996). "Molecular genetics: advances and problems." *Cad. Saúde Pública*, **12**
(1): 103-107.

Gershon, H., R. Ghirlando, et al. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. Biochemistry**:** 7143-7151.

Girao da Cruz, M. T., S. Simoes, et al. (2001). "Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex-cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1510**(1-2): 136-151.

Harvie, P., F. M. P. Wong, et al. (1998). "Characterization of lipid DNA interactions." Biophysics **75**: 1040-1051.

Hirsch-Lerner, D. and Y. Barenholz (1999). "Hydration of lipoplexes commonly used in gene delivery: follow-up by laurdan fluorescence changes and quantification by differential scanning calorimetry." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1461**(1): 47-57.

Hirsch-Lerner, D., M. Zhang, et al. (2005). "Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1714**(2): 71-84.

Katz, J. L. (1996). Applications of materials in medicine and dentistry: orthopedic applications. San Diego, USA, Academic Press.

Kikuchi, H., N. Suzuki, et al. (1999). "Gene delivery using liposome technology." Journal of controlled release **62**(1-2): 269-277.

Kim, S.-W., T. Ogawa, et al. (2004). "Efficacy and cytotoxicity of cationic-agent-mediated nonviral gene transfer into osteoblasts." Journal of Biomedical Materials Research, Part A **71A**(2): 308-315.

Kinnunen, P., J.-M. Alakoskela, et al. (2003). Phase Behavior of Liposomes
Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 129-147.

Koe, G. S., H. L. Way, et al. (1997). "The effect of mixing on the formation of DNA/liposome complexes." Pharmacy **14**.

Lasic, D. D. and N. S. Templeton (1996). "Liposomes in gene therapy." Advanced Drug Delivery reviews **20**(2-3): 221-266.

Laurencin, C. T., M. A. Attawia, et al. (2001). "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration." Biomaterials **22**(11): 1271-1277.

Leach, J. K. and D. Mooney (2004). "Bone engineering by controlled delivery os osteoinductive molecules and cells." Expert Opinion **4**(7).

Lima, N. and M. Mota (2003). Biotecnologia, fundamentos e aplicações. Lisboa, Lidel.

Luo, D. and W. M. Saltzman (2000). "Synthetic DNA delivery systems." Nature Biotechnology **18**: 33-37.

Luo, J., M. H. Sun, et al. (2005). "Gene therapy for bone regeneration." Curr Gene Ther **5**(2): 167-79.

Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(22): 12349-12354.

Monkkonen, J. and A. Urtti (1998). "Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids." Advanced Drug Delivery reviews **34**(1): 37-49.

Mui, B., L. Chow, et al. (2003). Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size

Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 3-14.

Nardi, N. B., L. A. K. Teixeira, et al. (2002). "Gene Therapy." Ciência & Saúde Coletiva **7**: 109-116.

Parsegian, V. A. (2005). Lipid-DNA Complexes.

Partridge, K. A. and R. O. Oreffo (2004). "Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies." Tissue Eng **10**(1-2): 295-307.

Pedroso de Lima, M. C., S. Simoes, et al. (2001). "Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications." Advanced Drug Delivery Reviews **47**(2-3): 277-294.

Penque, D. (2000). "Terapia Génica: um Objectivo ou uma Realidade." Boletim de Biotecnologia **66**: 16-19.

Pires, P., S. Simoes, et al. (1999). "Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1418**(1): 71-84.

Radwan Almofti, M., H. Harashima, et al. (2003). "Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization." Archives of Biochemistry and Biophysics **410**(2): 246-253.

Rejman, J., A. Bragonzi, et al. (2005). "Role od Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis in Gene Transfer Mediated by Lipo- and Polyplexes." Molecular Therapy **12**(3): 468-474.

Robertis, E. d., Robertis Jr., E.M. (1996). Biologia celular e molecular, Fundação Calouste Gulbenkian.

Rodriguez, R. B. and M. S. Xamani (2003). Liposomes Prepared by High-Pressure Homogenizers
Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 28-46.

Santos, N. C. and M. A. R. B. Castanho (2002). Lipossomas: a Bala Mágica Acertou? Química Nova On Line. **25:** 1055-1225.

Schubert, R. (2003). Liposome Preparation by Detergent Removal
Methods in Enzymology. Liposomes, Part A. N. Duzgunes, Academic Press**:** 46-70.

Simberg, D., D. Daninos, et al. (2001). "Phase Behaviour, DNA ordering, and Size instability of cationic lipoplexes." Journal of Biological Chemistry **276**(50): 47453-47459.

Simões, S., A. Filipe, et al. (2005). "Cationic liposomes for gene delivery." Expert Opinion **2**(2).

Simoes, S., P. Pires, et al. (2003). Gene Delivery by Cationic Liposome-DNA Complexes Containing Transferrin or Serum Albumin
Methods in Enzymology, Academic Press**:** 369-383.

Simoes, S., P. Pires, et al. (2003). Gene Delivery by Cationic Liposome-DNA Complexes Containing Transferrin or Serum Albumin
Methods in Enzymology. Liposomes, Part C. N. Duzgunes, Academic Press**:** 369-383.

Torricelli, P., M. Fini, et al. (2003). "Comparative interspecies investigation on osteoblast cultures: data on cell viability and synthetic activity." Biomedecine & Pharmacotherapy **57**(1): 57-62.

Tranchant, I., B. Thompson, et al. (2004). "Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids." The journal of gene medicine **6**: 24-35.

Tros de Ilarduya, C., M. A. Arangoa, et al. (2002). "Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1561**(2): 209-221.

Tseng, W.-C. and L. Huang (1998). "Liposome-based gene therapy." Research focus **1, nº 5**.

Tsuda, H., T. Wada, et al. (2003). "Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector." Molecular Therapy **7**(3): 354-365.

Weatherall, D. (1995). "Scope and limitations of gene therapy." British Medical Bulletin **51**(1): 1-11.

Winn, S. R., Y. Hu, et al. (2000). "Gene therapy approaches for modulating bone regeneration." Advanced Drug Delivery reviews **42**(1-2): 121-138.

Woo-Jeong Choia, Jin-Ki Kima, et al. (2004). "Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer." Biomaterials.

Zabner, J. (1997). "Cationic lipids used in gene transfer." Advanced Drug Delivery Reviews **27**(1): 17-28.

Zhdanov, R. I., O. V. Podobed, et al. (2002). "Cationic lipid-DNA complexes--lipoplexes--for gene transfer and therapy." Bioelectrochemistry **58**(1): 53-64.

Zuhorn, I. S. and D. Hoekstra (2002). "On the Mechanism of Cationic Amphiphile-mediated Transfection. To Fuse or not to Fuse: Is that the Question?" Journal of Membrane Biology **189**(3): 167-179.

Zuidam, N. J. and Y. Barenholz (1998). "Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1368**(1): 115-128.

Website

http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/
The journal of Gene Medicine, 2003

http://www.physics.helsinki.fi/~chelmine/annual04/fig044.html
University of Helsinki

http://dequim.ist.utl.pt/CQFM/BiolFluor/latnav_research_lipid-dna.html
Centro de Química-Física Molecular, 2002.
IST, Lisboa, Portugal.

http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes1Big.html
Avanti®Polar Lipids, Inc.