

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

***DESENVOLVIMENTO DE VACINA GÊNICA VEICULADA EM
ADJUVANTES LIPÍDICOS PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE***

Eng^a. Lucimara Gaziola de la Torre

Autora

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química na Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Campinas – São Paulo

Dezembro 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Torre, Lucimara Gaziola de la
T635d Desenvolvimento de vacina gênica veiculada em
adjuvantes lipídicos para tratamento de tuberculose /
Lucimara Gaziola de la Torre.--Campinas, SP: [s.n.],
2006.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Peptídeos. 3. Ácido
desoxirribonucleico. 4. Filmes finos. 5. Adsorção. 6.
Camada dupla de lipídios - Biotecnologia. 7. Simulação
(Computadores). I. Santana, Maria Helena Andrade. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Lipid adjuvants as carriers for tuberculosis DNA vaccine

Palavras-chave em Inglês: Cationic liposomes, DNA, Lipoplexes, Nuclear
localization signal, Peptide, Scale up,
Mathematical modeling, Liposome production

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Célio Lopes Silva, Clóvis Ryuichi Nakaie, Francisco
Benedito Teixeira Pessine, Maria Palmira Daflon
Gremião, Marisa Masumi Beppu

Data da defesa: 12/12/2006

Tese de Doutorado defendida por Lucimara Gaziola de la Torre e aprovada em 12 de Dezembro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



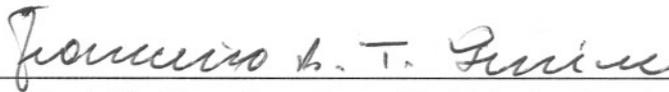
Profa. Dra. – Maria Helena Andrade Santana



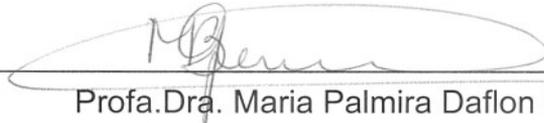
Prof. Dr. Célio Lopes Silva



Prof. Dr. Clóvis Ryuichi Nakaie



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine



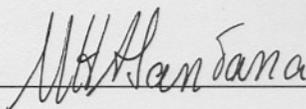
Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião



Prof. Dr. Marisa Masumi Beppu

200723670

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Esta pesquisa é dedicada em primeiro lugar ao nosso Criador, que nos ama
imensamente e muito deseja que construamos boas coisas,
à minha família por todo o apoio e incentivo,
ao João Nelson, amor da minha vida
e às minhas duas pérgias
mais que preciosas,
Lorane e Liza.

Esta pesquisa é dedicada em primeiro lugar ao nosso Criador, que nos ama
imensamente e muito deseja que construamos boas coisas,
à minha família por todo o apoio e incentivo,
ao João Nelson, amor da minha vida
e às minhas duas pérolas
mais que preciosas,
Lorena e Liza.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças à colaboração de muitas pessoas, principalmente à Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela orientação, apoio e incentivo durante todo o período de trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. César Costapinto Santana por ter disponibilizado o uso do seu laboratório, em especial ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela dedicação, presteza e muita criatividade em resolver os problemas e pela amizade.

Agradeço a todos os professores da Faculdade de Engenharia Química e da Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pelos conhecimentos adquiridos e pela experiência transmitida.

Agradeço a todos os colegas da Unicamp e, em especial, aos colegas do LDPB, Luciana, Luiza, Aline, Reinaldo, Amós, Fernando, Beatriz, Amanda, André, Patrícia e pelos que já saíram Adriano, Christiane, Classius, Elaine, Fernanda, Giuliana, Raquel, Tatiana, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço especialmente ao Ms Amós Luciano Carneiro pelo auxílio nas simulações matemáticas.

Agradeço ao Dr. Paulo de Tarso Hennies e Pamela Araujo Rodrigues da empresa NATURA pela oportunidade de realizar as análises de potencial zeta em sua empresa.

Agradeço ao Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin e Tereza Cristina Lima Silva do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS pela possibilidade de efetuar as análises de eletroforese em gel de agarose em seu laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Galembeck pelo uso do microscópio de transmissão de seu laboratório.

Agradeço ao Gustavo Souza do departamento de farmacologia da FCM-UNICAMP e pesquisador colaborador do Lab. ThoMSon de Espectrometria de Massas do Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, Instituto de Química da UNICAMP e Maria

Francesca Riccio Fonsêca da empresa T&E pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas.

Enfim, agradeço também à Fundação de Auxílio a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Este trabalho visa o desenvolvimento tecnológico de uma vacina gênica, destinada ao combate à tuberculose, na qual o DNA encontra-se veiculado em lipossomas. Foram enfocados três aspectos principais: 1. A preparação e caracterização de estruturas lipídicas funcionais veiculando o DNA, projetadas para atenderem aos requisitos de imunização contra a tuberculose; 2. Complexação do DNA com peptídeo sintético promotor de transporte nuclear e veiculação na estrutura lipossomal que se mostrou mais promissora nos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados no CPT-RP. 3. Análise do escalonamento da produção da estrutura lipossomal mais promissora para subsequente veiculação do DNA. Duas estruturas lipossomais foram compostas por lipídios com as seguintes funcionalidades: estrutural, de incorporação do DNA e atração eletrostática com a superfície das células, de intensificação da liberação do DNA no citoplasma celular. Foram preparadas pelo método da desidratação-rehidratação, gerando DRVs (“dehydrated-hydrated vesicles”). O DNA foi associado à essas estruturas, localizando-se no interior, [DRV(DNA)] ou preferencialmente na sua superfície [DRV-DNA]. A terceira estrutura, um agregado lipídico não lipossomal designado por lipoplexo, foi preparado na ausência do lipídio estrutural, contendo o DNA associado em toda a sua superfície. As estruturas foram caracterizadas através do seu diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos, razão de cargas para completa incorporação do DNA, carga superficial, transição de fases, acessibilidade de sonda de fluorescência ao DNA e morfologia. O peptídeo sintético com seqüência não convencional foi associado à estrutura DRV-DNA. O escalonamento da produção de lipossomas foi analisado através de dados experimentais e simulação matemática da cinética de produção de lipossomas em sistema multitubular. Dos resultados conclui-se que a estrutura DRV-DNA é promissora para a produção de vacina contra a tuberculose tanto pela sua efetividade biológica quanto do ponto de vista tecnológico.

Palavras chave: *lipossomas catiônicos, DNA, lipoplexo, peptídeo, sinal de direcionamento nuclear, escalonamento*

ABSTRACT

This work contributes to the technological development of a gene vaccine against tuberculosis, where DNA is transported within liposomes. The three main aspects focused on were: 1. Functional lipid structures for DNA delivery were prepared and characterized in the attempt to obtain immunization standards against tuberculosis; 2. The best lipid structure was chosen from *in vitro* and *in vivo* assays performed in the “Centro de Pesquisas em Tuberculose de Ribeirão Preto” – CPT-RP. A synthetic peptide that promotes nuclear transport was complexed to DNA and included into the best lipid structure. 3. Scale up analysis for the production of the best lipid structure that was used for DNA delivery. Two types of liposomes were composed by lipids with the following properties: (i) structure, (ii) DNA incorporation and electrostatic attraction with cell surface, and (iii) helper, that facilitates the DNA release to the cytosol. These structures were prepared by the dehydrated-hydrated method, generating DRVs (dehydrated-hydrated vesicles). The DNA was associated in the inner compartment, [DRV(DNA)], or mostly at the surface [DRV-DNA] of these structures. The third structure, a lipid aggregate that does not form liposomes and was named lipoplex, was prepared in the absence of the structural lipid, used in previous preparations, which contained DNA associated with all of the aggregate’s surface. The physico-chemical characterization of the structures were based on the hydrodynamic diameter and size distribution of the lipid particles, charge ratio for DNA incorporation into the lipid structure, surface charge, phase transition temperatures, the fluorescent probe accessibility to DNA and morphology of the particles. A synthetic peptide, with non-conventional sequence was associated to the DRV-DNA structure. The scale up for the liposome production was analyzed through the acquisition of experimental data and mathematical simulation of the liposomes production in a multitubular system. The results demonstrate that the incorporation of DNA into a lipid structure is very promising as a tuberculosis vaccine, especially in regards to the complexation of DNA with empty DRVs. The technological aspects of scaling up also confirm the viability of pre-formed liposomes production.

Key words: cationic liposomes, DNA, lipoplexes, nuclear localization signal, peptide, scale up, mathematical modeling, liposome production

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
SUMÁRIO.....	xv
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxxiii
NOMENCLATURA	xxxv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. DNA plasmideal	7
3.2. Vacinas gênicas ou de DNA	10
3.3. Adjuvantes lipídicos	12
3.3.1. Lipoplexos	12
3.3.2. Lipossomas	14
3.3.3. Razão entre cargas	18
3.4. Processo de transfecção	19
3.4.1. Internalização do complexo lipídico para o citoplasma	19
3.4.2. Liberação do DNA para o citoplasma	20
3.4.3. Entrada do DNA no núcleo celular e direcionamento nuclear	23
3.4.3.1. Poro Nuclear e transporte cito-nucleoplasmático	25

3.4.3.2. Diversidade de sinais direcionadores para o núcleo (NLSs)	27
3.4.3.3. Conjugação de sinais direcionadores para o núcleo com DNA	29
3.5. Processos Escalonáveis para Produção de Lipossomas.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Materiais	37
4.2. Equipamentos	38
4.3. Formulações lipídicas	40
4.4. Preparações lipídicas.....	43
4.4.1. Preparação das estruturas lipídicas para testes <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e caracterizações físico-químicas.....	43
4.4.1.1. Lipossomas Extrudados: LEs	45
4.4.1.2. Lipossomas obtidos pelo método da desidratação-rehidratação: DRVs	45
4.4.1.3. Agregados lipídicos catiônicos.....	45
4.4.1.4. DNA associado à superfície externa de lipossomas extrudados: LEs-DNA.....	46
4.4.1.5. DNA incorporado em lipossomas DRVs: DRV(DNA).....	46
4.4.1.6. DNA associado à superfície externa dos lipossomas DRVs: DRV- DNA	46
4.4.1.7. Lipoplexos.....	47
4.4.1.8. Preparação do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo	47
4.4.2. Lipossomas produzidos em sistema tubular	48
4.5. Caracterizações físico-químicas	49
4.5.1. Integridade do plasmídeo	49
4.5.1.1. Separação e purificação de DNA encapsulado/complexado com estruturas lipídicas	50

4.5.1.2. Digestão do plasmídeo pVAXhsp65 com enzimas de restrição Bam HI	50
4.5.1.3. Eletroforese em gel de agarose	51
4.5.2. Incorporação do DNA nas estruturas	51
4.5.2.1. Determinação da razão molar para completa incorporação do DNA nas estruturas lipídicas (sistemas contendo lipídios e DNA)	52
4.5.2.2. Determinação da proporção molar para completa incorporação do DNA nas estruturas DNA-peptídeo	52
4.5.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos para estruturas lipídicas.....	52
4.5.3.1. Diâmetro médio da dispersão coloidal.....	53
4.5.3.2. Área superficial por unidade de massa: As/M.....	53
4.5.4. Estabilidade física de estocagem	54
4.5.5. Determinação do diâmetro médio dos complexos DNA-NLS	54
4.5.6. Transição de fases	54
4.5.7. Carga superficial	55
4.5.8. Acessibilidade de sonda de fluorescência ao DNA incorporado na estrutura lipídica ou no complexo binário DNA/peptídeo	56
4.5.9. Morfologia das estruturas lipídicas	57
4.5.10. Cinética da formação dos lipossomas em sistema capilar	58
4.5.11. Determinação da espessura do filme lipídico seco formado em tubo capilar	58
4.5.12. Identificação qualitativa da presença dos lipídios funcionais nos lipossomas produzidos em tubo capilar.....	59
4.6. Modelagem da Cinética de Formação dos Lipossomas	59

4.6.1. Construção do modelo de formação de lipossomas a partir de um filme lipídico seco depositado sobre uma superfície de vidro de um tubo capilar	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Integridade do plasmídeo nos processos de desidratação-rehidratação e complexação eletrostática	70
5.2. Caracterizações físico-químicas das estruturas destinadas aos ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	73
5.2.1. Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanhos e área superficial	73
5.2.2. Incorporação do DNA nas estruturas	79
5.2.2.1. Incorporação do DNA nas estruturas lipídicas para $R_{+/-}$ 10	80
5.2.2.2. Razão entre cargas para completa incorporação do DNA.....	81
5.2.3. Carga superficial	83
5.2.4. Transição de fases	85
5.2.4.1. Influência da composição lipídica	87
5.2.4.2. Influência da presença do DNA	88
5.2.5. Acesso da sonda de fluorescência (PicoGreen) ao DNA	92
5.2.6. Morfologias.....	96
5.2.7. Estabilidade física ao longo da estocagem	107
5.2.8. Considerações sobre a preparação dos DRVs	110
5.2.8.1. Avaliação da etapa de extrusão.....	110
5.2.8.2. Estocagem dos lipossomas liofilizados.....	112
5.3. Escolha da estrutura lipossomal mais promissora.....	114
5.3.1. Detecção da mensagem para hsp65 <i>in vitro</i> por RT-PCR	114
5.3.2. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	117

5.3.3. Avaliação do efeito profilático das estruturas lipídicas	120
5.4. Inclusão de peptídeo com sinal direcionador para o núcleo na formulação DRV-DNA	127
5.4.1. Caracterização do sistema binário DNA-peptídeo.....	128
5.4.1.1. Determinação da proporção DNA-peptídeo para completa incorporação	128
5.4.1.2. Avaliação do diâmetro médio do complexo binário DNA-peptídeo	130
5.4.2. Caracterização do sistema ternário Lipossoma-DNA-peptídeo.....	134
5.4.2.1. Determinação da distribuição de tamanhos, diâmetro médio hidrodinâmico e da densidade de carga do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo	134
5.4.2.2. Acesso da sonda de fluorescência	137
5.4.2.3. Morfologia dos Complexos Ternários DRV-DNA-peptídeo	142
5.5. Análise do escalonamento da produção de lipossomas	147
5.5.1. Concepção do Processo.....	148
5.5.2. Caracterização físico-química dos lipossomas.....	151
5.5.2.1. Identificação qualitativa da presença dos lipídios funcionais nos lipossomas produzidos pela unidade escalonável.....	151
5.5.2.2. Distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico.....	153
5.5.2.3. Densidade de carga – Potencial zeta.....	154
5.5.3. Cinética da formação dos lipossomas	155
5.5.4. Determinação da espessura do filme lipídico no sistema capilar....	159
5.5.4. Simulação matemática da produção mássica de lipossomas.....	160
5.5.4.1. Determinação dos parâmetros K_t e K_t'	161
5.5.4.2. Determinação do parâmetro K_v	165

5.5.4.3. Determinação do parâmetro K_{ext}	166
5.5.4.4. Simulação matemática da cinética de formação dos lipossomas e predição da espessura do filme lipídico seco	167
6. CONCLUSÕES	171
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	175
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
10. ANEXOS	185
ANEXO I: Nomenclatura internacional IUPAC para os aminoácidos	185
ANEXO II : Vetor de expressão pVAX1	186
ANEXO III : Histórico térmico para DRVs e agregados lipídicos	187
ANEXO IV: Resumo da Dissertação de Mestrado “Vacina de DNA pVAX-Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração” (Fonte: Rogério Silva Rosada, Dissertação de Mestrado, FCM-USP-RP)	189
ANEXO V: Conclusões da Dissertação de Mestrado “Vacina de DNA pVAX- Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração” (Fonte: Rogério Silva Rosada, Dissertação de Mestrado, FCM-USP-RP)	191
ANEXO VI: Ensaio biológicos	192
ANEXO VII: Relação molar entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA	196
ANEXO VIII: Determinação do tempo de eletroforese para o complexo binário DNA-peptídeo	198

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura dos desoxirribonucleotídeos. 7
- Figura 2: Bases nitrogenadas. As bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA são adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) (Adaptado de Lehninger et al., 1993). 8
- Figura 3: Modelo da molécula de DNA proposto por Watson & Crick, 1953. a) A molécula de DNA consiste em duas cadeias enroladas na mesma direção axial. b) Ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. c) Ligações de hidrogênio entre adenina-timina e guanina e citosina. (adaptado de http://whyfiles.org/126dna_forensic/images/dna.gif, 2004). 9
- Figura 4: Distribuição de ácidos graxos existentes na fosfatidilcolina natural de ovo (<http://www.avantilipids.com>, 2004). 17
- Figura 5: Estrutura molecular característica de uma molécula de fosfatidilcolina. R₁ e R₂, nas posições *sn*-1 e *sn*-2 correspondem a cadeias acila de diferentes comprimentos e graus de insaturação (Figura 4). 17
- Figura 6: Estrutura molecular correspondente ao lipídio moncatiônico, cloreto de 1,2-dioleoil-3-Trimetilamônio-Propano (DOTAP). 18
- Figura 7: Estrutura molecular do co-lipídio ou “helper” 1,2-dioleoil-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamina (DOPE). 18
- Figura 8: Mecanismo de liberação do DNA do complexo DNA/lipossoma catiônico (Xu & Szoka, 1996). ETAPA 1: Endocitose do complexo lipossoma catiônico/DNA. ETAPA 2: “Flip- flop” dos lipídios aniônicos presentes na membrana endossomal desestabilizam o endossoma. ETAPA 3: Formação de pares iônicos neutros entre lipídios catiônicos e aniônicos. ETAPA 4: Difusão do DNA para o citoplasma (Adaptado de Xu & Szoka, 1996). 21
- Figura 9: Modelo proposto para a veiculação de DNA para facilitar a internalização no citoplasma celular, através do emprego de lipídios catiônicos e direcionamento nuclear através da complexação do DNA com peptídeos sinalizadores NLS (adaptado de Munkonge et al., 2003). 25

- Figura 10: Micrografia obtida a partir de microscopia eletrônica de transmissão indicando os poros nucleares. A). Corte transversal de uma célula indicando o poro nuclear. B) Microscopia eletrônica da superfície do envelope nuclear (NE) (Adaptado de Alberts et al., 1994 e http://cellbio.utmb.edu/cellbio/nuclear_envelope.htm, 2004). 27
- Figura 11: Sequência de aminoácidos do peptídeo de característica de direcionamento nuclear (NLS). O terminal amino encontra-se no início da sequência com a lisina (K) e o terminal carboxílico com a cisteína (C). 38
- Figura 12: Representação unidimensional do processo de formação de lipossomas a partir da dessorção do filme lipídico seco, presente no interior de um tubo. Inicialmente ocorre a formação de uma frente de penetração de líquido, L_p (Comprimento referente à penetração de água que varia com o tempo); e a subsequente formação da frente de dissolução dos lipídios do filme lipídico seco, L_d (Comprimento referente à extensão desintegrada, que varia com o tempo). A dessorção dos lipídios para a fase aquosa permite que ocorra a agregação e formação dos lipossomas..... 66
- Figura 13: Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do plasmídeo pVAX-hsp65 em estruturas lipídicas do tipo DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexos com razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 em solução salina (NaCl 0,9%). O plasmídeo foi separado de cada preparação lipídica através da adição de solvente orgânico (clorofórmio/metanol 9:1 v/v), purificado com etanol e digerido com enzima de restrição Bam HI. Plasmídeos padrão e extraído foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Cada linha representa: M) Marcador de 1Kb; 1) DNA separado de lipoplexos; DNA separado de 2) DRV-DNA, 3) DRV(DNA), 4) DNA padrão. 71
- Figura 14: Esquema ilustrativo das rotas de preparação para DNA incorporado em estruturas DRVs (DRV(DNA)), DNA complexado com estruturas DRVs (DRV-DNA) e lipoplexos, com seus respectivos precursores. 72
- Figura 15: Distribuição de tamanho dos lipossomas catiônicos compostos por PC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar) nas várias etapas de processamento para formação das estruturas DRVs. A) Após a hidratação do filme seco com

água padrão para injeção. B) Lipossomas extrudados em membranas de policarbonato, de poros com diâmetro nominal de 100 nm. C) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV em solução salina (NaCl 0,9%). D) Lipossomas produzidos pelo método DRV encapsulando DNA a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%). Cada gráfico apresenta a distribuição de tamanhos de três amostras independentes. E) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV e complexados com DNA a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%). 75

Figura 16: Distribuição de tamanho das estruturas lipídicas formadas por DOPE/DOTAP 50/50% molar em solução salina 0,9%. A) Agregado lipídico. B) Lipoplexo composto por agregados lipídicos e DNA, razão de cargas 10. Cada gráfico apresenta a distribuição de tamanhos de três amostras independentes..... 77

Figura 17: Gel de agarose 0,75% para DRV-DNA (Lipossomas DRVs complexados com DNA) e DRV(DNA) (Lipossomas encapsulando DNA) com razão de cargas ($R_{+/-}$) 10, compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (percentagem molar) em solução salina 0,9%. Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) DRV(DNA) $R_{+/-}$ 10; 3) DRV-DNA $R_{+/-}$ 10..... 80

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose para várias estruturas lipídicas catiônicas obtidas em solução salina (NaCl 0,9%) e complexadas com DNA durante 10 minutos à temperatura ambiente, em várias razões de cargas ($R_{+/-}$): A) Complexos Lipossomas extrudados-DNA (LEs-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. B) Lipoplexos (Agregados lipídicos-DNA) compostos por DOPE/DOTAP 50/50% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. C) DRV-DNA (Lipossomas do Tipo-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. 82

Figura 19: Termograma comparativo das várias estruturas lipídicas. As composições lipídicas são: (i) DRV vazio, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar. (ii) DRV(DNA) e DRV-DNA, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar, $R_{+/-}$ 10. (iii) Agregado lipídico, DOPE/DOTAP 50/50 % molar. (iv) Lipoplexo, DOPE/DOTAP 50/50 % molar, $R_{+/-}$ 10. Taxa de aquecimento de 10°C/minuto.	86
Figura 20: Diagrama esquemático descrevendo os mecanismos de organização da bicamada lipídica (DOPE/DOTAP 1:1) quando complexado com o DNA em diferentes razões de carga, $R_{+/-} < 1$ e $R_{+/-} > 1,66$ (adaptado de Hirsch-Lerner & Barenholz, 1998).....	92
Figura 21: Espectros de fluorescência da sonda PicoGreen nas moléculas do tipo DNA dupla fita (dsDNA), DNA fita simples (ssDNA) e RNA. As amostras foram excitadas em comprimento de onda de 480 nm. (http://www.probes.com/handbook/figures/1549.html , 2004)	93
Figura 22: Intensidades de fluorescência (% do inicial – referente ao DNA livre) em função de $R_{+/-}$ nas estruturas DRV-DNA (-■-)(EPC/DOPE/DOTAP, 50:25:25 % molar) e Lipoplexos (-●-)(DOPE/DOTAP, 50:50 % molar) para complexações realizadas em várias razões de carga, em água ultra pura (Milli-Q).	94
Figura 23: Micrografias de lipossomas do tipo DRV vazios (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 100nm.	98
Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas do tipo DRV encapsulando DNA em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 200nm, C) 100 nm, D) 100 nm.....	99
Figura 25: Micrografias de lipossomas do tipo DRV complexados com DNA em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm.....	100
Figura 26: Micrografias dos agregados lipídicos (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). Barras indicam A) 400 nm, B) 100nm.....	103

- Figura 27: Micrografias dos lipoplexos (agregados lipídicos complexados com DNA em razão de cargas $R_{+/-} = 10$) (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm..... 104
- Figura 28: Diagrama esquemático das alterações morfológicas provocadas nas estruturas lipídicas catiônicas quando complexadas com poliânions (adaptado de Wasan et al., 1999) 106
- Figura 29: Distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico das estruturas lipídicas ao longo da estocagem sob refrigeração. A) DRV vazio; B) DRV encapsulando DNA [DRV(DNA)]; C) DRV complexando DNA [DRV-DNA]; D) Agregados lipídicos; E) Lipoplexos..... 108
- Figura 30: Distribuição de tamanhos dos lipossomas catiônicos do tipo DRV, contendo EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25 % molar em solução salina 0,9%) obtidos a partir de A) lipossomas que não sofreram extrusão e B) Lipossomas que foram previamente extrudados e C) Três medidas obtidas para uma mesma amostra. As curvas dos gráficos A e B referem-se a duas amostras independentes..... 111
- Figura 31: Distribuição de tamanhos dos lipossomas catiônicos do tipo DRV contendo EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25 % molar) rehidratados após um ano de estocagem sob vácuo relativo de 650 mmHg e refrigeração (8°C). Cada distribuição representa uma amostra de lipossoma independente (n=3)..... 113
- Figura 32: Detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* utilizando o RT-PCR. Macrófagos da linhagem J774 foram transfectados com as diferentes formulações lipossomais durante 72 horas e extraído o seu RNA total. A presença de mensagem nessas células foi detectada por RT-PCR utilizando os *primers* específicos para hsp65. A qualidade do cDNA utilizado foi checada pela ampliação da β -actina. A amplificação das amostras tratadas com DNase I está identificada por DNase (-), o que indica se ainda há ou não DNA nessas amostras tratadas. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1 %) e as bandas visualizadas por coloração com brometo de etídio. pb: pares de bases (Fonte: Rosada, 2006)..... 116

Figura 33: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em macrófagos J774 através do emprego de metodologia baseada na redução do brometo de tiazolil - (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - sal de tetrazólio MTT para as diferentes construções lipídicas vazias, contendo o plasmídeo pVAX-hsp 65 ou contendo somente o vetor comercial pVAX. Os gráficos representam os seguintes grupos: A) DNA nu; B) Grupo dos DRVs, onde (-●-) DRV-DNA, (-★-) DRV(DNA), (-○-) DRV vazio; C) Grupo dos lipoplexos, onde (-◇-) Agregado lipídico e (-△-) lipoplexos. (Fonte: Rosada 2006). 118

Figura 34.: Produção de IFN- γ por células do pulmão de animais vacinados com DNA Hsp65 nu e diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 3 doses de 100 μ g de DNA nu Hsp65 ou com uma única dose de 50 μ g de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da imunização, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para determinação da produção de citocinas por ELISA. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão de cada grupo. Este experimento é representativo de 2 outros com resultados similares. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos vetores e ao grupo Mtb (Fonte: Rosada, 2006). 122

Figura 35: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com DNA Hsp65 nu ou diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 3 doses de 100 μ g de DNA nu Hsp65 ou com uma única dose de 50 μ g de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10^5

bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados são representados em $\log_{10} \pm$ desvio padrão do CFU/g de cada grupo. Este experimento é representativo de 2 outros com resultados similares (Fonte: Rosada, 2006)..... 123

Figura 36: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis*.(Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 2 doses de 50 μ g de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas a intervalos quinzenais. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados são representados em $\log_{10} \pm$ desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao Mtb (Fonte: Rosada, 2006). 124

Figura 37: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por instilação intranasal com uma dose de 25 μ g de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o

desafio, os animais foram sacrificados e seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados são representados em $\log_{10} \pm$ desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao Mtb (Fonte: Rosada, 2006). 125

Figura 38: Comparação entre a recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes doses, construções e rotas e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados com uma dose de 50 μg de DNA Hsp65 ou 2 doses de 50 μg de DNA Hsp65 por via intramuscular, ou com uma dose de 25 μg de DNA Hsp65 por instilação intranasal. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados são representados em $\log_{10} \pm$ desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao Mtb (Fonte: Rosada, 2006). 126

Figura 39: Fotografia do gel de agarose 0,75% para o complexo DNA-peptídeo (com seqüência de aminoácidos com sinal direcionador para núcleo celular) em solução salina 0,9% a várias proporções molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA. As linhas representam: 1) DNA (pVAXhsp65); Razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} : 2) 0,2; 3) 0,3; 4) 0,4; 5) 0,5; 6) 0,6; 7) 0,7; 8) 0,8; 9) 0,9; 10) 1,0. 129

Figura 40: Micrografia do complexo intermediário formado pelo DNA e peptídeo a uma razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA de 1. Complexação diluída em solução salina 0,9%. Barras indicam A) 200 e B) 100 μm 132

Figura 41: Histograma referente à distribuição de tamanhos do complexo binário formado por DNA e peptídeo com seqüência de aminoácidos com sinal

direcionador para núcleo celular, em proporção molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA de 1.....	133
Figura 42: Distribuições de tamanho dos complexos contendo lipossomas catiônicos-DNA-peptídeo. A) Após 40 minutos de complexação; Complexos mantidos sob refrigeração com 1 dia (B), 4 (C) dias e 7 (D) meses de estocagem. Gráficos A, B e C são compostos por distribuições distintas e provenientes de três complexações independentes (n=3).....	135
Figura 43: Intensidade de fluorescência da sonda PicoGreen dos complexos DNA-NLS em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA, em água ultra pura (Milli-Q). A intensidade de fluorescência em termos de % do inicial refere-se ao DNA na ausência de peptídeo. As barras de erro referem-se a três complexações independentes para cada ponto da curva (n=3).....	137
Figura 44: Intensidade de fluorescência da sonda PicoGreen dos complexos ternários DRV-DNA-peptídeo, na proporção DRV/DNA ($R_{+/-}$ 10) já estabelecida para os teste <i>in vivo</i> ; porém, em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA, em água ultra pura (Milli-Q). A) A intensidade de fluorescência em termos de % do inicial refere-se ao DNA livre, na ausência de peptídeo e lipossomas. B) Intensidade de fluorescência absoluta para o sistema ternário, em diferentes quantidade de peptídeo catiônico. As barras de erro referem-se a três complexações independentes para cada ponto da curva (n=3).....	140
Figura 45: Micrografia do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo. As barras indicam A) 400 nm, B) 100nm, C) 100 nm, D) 100 nm.....	143
Figura 46: Micrografia do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo. As barras indicam A) 40 nm, B) 40nm, C) 100 nm, D) 100 nm.	144
Figura 47: Microscopia eletrônica de transmissão do complexo ternário DRV-DNA-NLS. As barras indicam E) 20 nm, F) 20nm, C) 40 nm, D) 40 nm.	145

Figura 48: Fluxograma de processo para produção de lipossomas catiônicos a partir de estruturas lipídicas secas obtidas no interior de capilar de adsorção em leito fixo.....	148
Figura 49: Espectros de massa para a solução alcoólica inicial de 70 mM, contendo os três lipídios (EPC/DOPE/DOTAP) (A) e o respectivo lipossoma produzido na unidade escalonável (B).	152
Figura 50: Distribuição de tamanhos dos lipossomas obtidos a partir de uma dispersão alcoólica de lipídios (EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar) em sistema capilar. Concentração total de lipídios na fase alcoólica: A) 5mM; B) 10mM; C) 20mM; D)30 mM; E) 40mM; F) 50mM; G) 60mM; H) 70 mM. Cada distribuição foi construída em triplicata independente (n=3).	153
Figura 51: Cinética de formação de lipossomas catiônicos compostos por EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar), em termos de absorbância a 340 nm, a partir de uma dispersão inicial em fase alcoólica com concentração total de lipídios de A) 50mM e B) 60 mM. Os desvios padrão referem-se às triplicatas (n=3).....	156
Figura 52: Relação entre concentração de fosfolipídios e absorbância a 340 nm.	157
Figura 53: Cinética de formação de lipossomas catiônicos compostos por EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar), em termos de massa dissolvida, a partir de uma dispersão inicial em fase alcoólica com concentração total de lipídios de A) 50mM e B) 60 m. Os desvios padrão referem-se às triplicatas (n=3).....	158
Figura 54: Micrografia obtida a partir de microscopia eletrônica de varredura do tubo capilar para identificação do filme lipídico seco, utilizando uma concentração de lipídios totais de 50 mM na fase alcoólica. As barras referem-se à 2 (A) e 1 μ m (B).....	159
Figura 55: Histograma da distribuição das espessuras de filme lipídico seco, utilizando uma concentração de lipídios totais de 50 mM na fase alcoólica.	160

Figura 56: Concentração de vesículas ao longo em função do tempo para as concentrações de 50 (-■-) e 60 (-○-) mM.	163
Figura 57: Determinação dos parâmetros da equação da concentração de vesículas em função do tempo a partir das absorbâncias a 340 nm medidas durante a formação dos lipossomas. A) Concentração inicial do total de lipídios 50 mM e B) 60 mM.....	164
Figura 58: Comparação entre dados experimentais e simulação matemática para a formação dos lipossomas nas duas concentrações totais de lipídios na fase alcoólica de 50 (A) e 60 (B) mM. A linha contínua representa a simulação matemática, enquanto (■) representa os dados experimentais, conforme descrito na Figura 53.....	167
Figura 59: Variação do comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido (L_p , —) e do comprimento do filme lipídico dissolvido (L_d , ----) com o tempo, para as concentrações lipídicas totais em fase alcoólica de 50 (A) e 60 (B) mM.	168
Figura 60: Mapa com informações gerais sobre o vetor pVAX utilizado para vetorizar o segmento de DNA que codifica o antígeno <i>M.leprae</i> Hsp65	186
Figura 61: Histórico térmico dos lipossomas vazios preparados pelo método DRV (PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar), na faixa de temperatura -30 a +60°C. Taxa de aquecimento: 10 °C/min.	188
Figura 62: Histórico térmico do agregado lipídico (DOPE/DOTAP 50/50% molar), na faixa de temperatura -30 a +60°C. Taxa de aquecimento: 10 °C/min. ...	188
Figura 63: Eletroforese em gel de agarose 0,75% do complexo DNA-peptídeo (com seqüência de aminoácidos com sinal direcionador para núcleo celular) em solução salina 0,9% em duas proporções molares de cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA. Eletroforese após A) 40 minutos e B) 2 horas de corrida. Para ambas as Figuras 4 A e B, as linhas representam: 1) DNA (pVAXhsp65); Razão molar NH_4^+/PO_4^{3-} 2) 1; 3) 10.....	198

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peptídeos sinalizadores nucleares e seu sequenciamento.	28
Tabela 2: Técnicas de conjugação entre DNA e NLS e suas principais vantagens e desvantagens.	31
Tabela 3: Formulações lipídicas utilizadas para lipossomas catiônicos do tipo DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexo, para uma razão de cargas ($R_{+/-}$, lipídio catiônico/DNA) 10.	41
Tabela 4: Formulação utilizada para a obtenção de 1 mL de vacina lipossomal contendo DNA e peptídeo com sinal direcionador.	42
Tabela 5: Sumário das estruturas lipídicas vazias e associadas ao DNA, identificando as respectivas nomenclaturas, designação, posicionamento relativo do DNA, método de preparação e item da metodologia.	44
Tabela 6: Diâmetros médios das populações encontradas na distribuição de tamanhos das estruturas lipídicas avaliadas.	74
Tabela 7: Diâmetro médio e área superficial por unidade de massa das várias estruturas lipídicas.	78
Tabela 8: Razão de cargas ($R_{+/-}$) para completa incorporação do DNA nas estruturas lipídicas.	81
Tabela 9: Valores de potencial zeta das estruturas lipídicas obtidas em $R_{+/-}$ 10... ..	84
Tabela 10: Temperatura de transição de fases, variação de entalpia e entropia para as diferentes estruturas lipídicas obtidas através de calorimetria exploratória diferencial (DSC).	86
Tabela 11: Estratégia para avaliação do desempenho da vacina gênica em ensaios <i>in vivo</i>	120
Tabela 12: Diâmetro médio hidrodinâmico das populações do complexo DRV-DNA-peptídeo ao longo da estocagem (8°C).	135
Tabela 13: Valores de potencial zeta para os lipossomas produzidos pelo método da Bangham e pela unidade escalonável.	155

Tabela 14: Parâmetros K_t e K'_t estimados para as concentrações totais de lipídios de 50 e 60 mM	164
Tabela 15: Parâmetro K_v e K_{ext} estimados para as concentrações totais de lipídios de 50 e 60 mM.	165
Tabela 16: Parâmetros ajustados durante a simulação da formação dos lipossomas.	166
Tabela 17: Espessura do filme lipídico seco obtido pela modelagem da cinética de formação dos lipossomas para cada uma das concentrações estudadas. ..	169
Tabela 18: Valores de T_m e ΔH utilizados para a investigação do histórico térmico para DRV vazio e agregado lipídico.	187
Tabela 19: Quantidade de aminas disponíveis para interação eletrostática com PO_4^{3-}	197
Tabela 20: Estabelecimento da carga líquida de aminas disponíveis para interação eletrostática com PO_4^{3-}	197

NOMENCLATURA

bp:	Pares de bases
BPDA :	Bis [2- (11- phenoxyundecanoate) ethyl]dimethylammonium bromide;
C _s :	Concentração de fosfolípidios próxima à superfície do sólido;
C _{ext} :	Concentração de fosfolípidios no meio líquido externo;
C _v :	Concentração de vesículas;
cDNA:	DNA complementar, fita simples, obtido a partir de uma seqüência de RNA e pela ação de uma enzima do tipo transcriptase reversa;
D:	Coeficiente de difusão das partículas;
DDAB:	Brometo de dimetildioctadecil amônio;
d _H :	Diâmetro hidráulico dos poros do sólido;
DMPC:	Dimiristoilfosfatidilcolina;
DNA:	Ácido desoxirribonucleico;
DRV:	Método de Desidratação-Rehidratação;
DRV(DNA):	Lipossomas obtidos a partir do método DRV encapsulando DNA;
DRV-DNA:	Lipossomas obtidos pelo método DRV complexados eletrostaticamente com o DNA;
DODAB:	Brometo de dioctadecil dimetilamônio;
DODAP:	1,2-diacil-3-dimetilamônio-propano;
DOPC:	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero- <i>sn</i> -3-fosfatidilcolina;
DOPE	L- α -dioleoil fosfatidiletanolamina;
DOTAP:	1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano;

DOTMA:	Cloreto de dioleoxi propil trimetil amônio;
DOSPA:	2,3 Dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1-propanamínio;
DSC:	Calorimetria exploratória diferencial;
DSPC:	Distearoilfosfatidilcolina;
DsDNA:	DNA dupla fita;
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético;
ESI-MS	Espectrometria de massa por ionização em eletron-spray;
EPC:	L- α -fosfatidilcolina de ovo;
EtBr:	Brometo de etídio;
EtBr-DNA:	Brometo de etídio intercalado ao DNA;
FDA:	Food and Drug Administration;
H _{II} :	Fase hexagonal inverse;
Hps 65:	Proteína do tipo <i>heat shock</i> utilizada nos estudos para vacinação contra a tuberculose;
k:	Constante de Boltzmann;
k _d :	Coeficiente de transferência de massa;
K:	Constante de penetração;
K _{int} :	Constante de transferência de massa interna;
K _v :	Taxa de reação de produção de vesículas;
L ^c _{α} :	Fase lamellar;
L:	Comprimento dos Tubos de Vidro;
l:	Comprimento característico da transferência de massa;
L _p :	Comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido;
L _d :	Comprimento do filme lipídico dissolvido;

LPS:	Lipossacarídeo;
LUV:	Vesículas unilamelares grandes;
M _{DNA} :	Massa de DNA (mg);
M _{L+} :	Massa de lipídio catiônico (mg);
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão;
MLV:	Vesículas multilamelares;
mRNA:	Ácido ribonucleico mensageiro;
MW(L ⁺):	Massa molar do lipídio catiônico;
MW(bp):	Massa molar média de um par de bases;
n:	Número de amostras;
N:	Número de agregação;
NE:	Envelope Nuclear;
NPC:	Poros nucleares;
NLS:	Sinal direcionador para o núcleo;
ODN:	Oligo nucleotídeos;
pDNA:	DNA plasmideal;
PC:	Fosfatidilcolina;
PCR:	Reação em cadeia da polimerase;
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PE:	Fosfatidiletanolamina;
PNA:	Conjugado peptídeo-ácido nucleico;
pVAX:	Vetor plasmideal;
R _{+/-} :	Razão de cargas, relação entre moles de cargas positivas de lipídios catiônicos e cargas negativas do DNA;
Re:	Reynolds, número adimensional;

RT-PCR:	Transcriptase reversa , reação da cadeia de polimerase;
S_{ext} :	Área externa do sólido do comprimido;
S_{int} :	Área dos poros penetrada pelo líquido;
S_0 :	Superfície externa total do sólido;
S_c :	Schmidt, número adimensional;
SD:	Desvio padrão;
SDS:	Dodecil sulfato de sódio;
Sh:	Sherwood, número adimensional;
ssDNA:	DNA fita simples;
SUV:	Vesículas unilamelares pequenas;
SV 40T:	<i>Simian Virus 40 large tumor antigen</i> ;
t:	Tempo;
T:	Temperatura absoluta;
T_m :	Temperatura de transição de fases;
TAE 1 X:	Solução tampão contendo 40 mM TRIS-Acetato, 1 mM EDTA;
TE:	Solução tampão contendo 10mM Tris/HCl/1mM EDTA, pH 7,5;
TRIS:	Tris[hidroximetil]aminometano;
v:	Velocidade do líquido;
ε :	Porosidade do sólido;
μ :	Viscosidade do solvente;
ΔH :	Variação de entalpia;
ΔS :	Variação de entropia;
σ :	Tensão superficial do líquido;
θ :	Ângulo de contato do líquido com o sólido;

- τ : Tortuosidade do sólido;
- η : Viscosidade do líquido;
- ρ : Massa específica;
- ζ : Potencial Zeta.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a terapia da tuberculose tem despertado grande interesse em nível mundial, devido à elevada taxa de mortalidade de indivíduos afetados por essa doença. Anualmente são registrados 3 milhões de mortes e 8 milhões de novos casos, sendo que cerca de 2 bilhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo. Apesar da eficácia comprovada dos antibióticos usados na terapia da tuberculose, quando esses fármacos são administrados na forma livre produzem efeitos colaterais que, aliados ao longo tempo de tratamento (no mínimo 6 meses após o diagnóstico), tem conduzido ao abandono do tratamento e ao aparecimento de resistência quando da re-incidência da doença. Esses fatores juntamente com o aumento da incidência da AIDS, são as principais causas dos elevados índices de mortalidade.

O problema requer medidas urgentes e, nesse sentido, novas estratégias estão sendo desenvolvidas no campo da terapia e vacinação ou imunoterapia. Atualmente, a prevenção da tuberculose é realizada em diversas partes do mundo pela utilização da vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), obtida entre 1906 e 1919 pela atenuação de um bacilo isolado denominado *Mycobacterium bovis*. Porém, após estudos entre diferentes populações de várias regiões, verificou-se que a eficiência de imunização varia entre zero e 80% (Fine, 1989). Uma das dificuldades encontradas na imunoterapia é que o agente causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, esconde-se dentro das células humanas, onde não é atingido pela ação dos anticorpos. Desta forma seria necessário estimular os linfócitos T CD8, capazes de destruir especificamente as células infectadas pelos bacilos, mas estes linfócitos são estimulados somente quando os antígenos são produzidos dentro das células, como acontece nas infecções virais. Assim, o desenvolvimento de uma vacina gênica, considerada de terceira geração, constitui uma alternativa promissora para o tratamento da tuberculose. Nesse contexto, em 1999 o Prof. Dr. Célio Lopes Silva mostrou que vacinas de DNA inicialmente projetadas para prevenção da infecção

apresentavam também pronunciada ação terapêutica em ratos (Lowrie et al., 1999). Esses resultados apontam na direção de que a aplicação da imunoterapia em conjunção com a quimioterapia convencional deve garantir a cura mais rápida da doença em humanos.

O DNA nu (“naked” DNA) é uma nomenclatura utilizada na literatura internacional para aplicações de vacinas gênicas sem a presença de adjuvantes, isto é, apenas o DNA em um veículo apropriado. O DNA nu é quimicamente instável quando em contato com vários componentes corpóreos. Devido ao seu tamanho e carga negativa o processo de transfecção (entrada nas células e no núcleo) é dificultado (Lasic, 1997, Ropert, 1999). A injeção intramuscular é a forma mais comumente utilizada nos estudos da eficiência de vacinas de DNA sendo que, neste caso, grande parte do DNA é degradado por nucleases presentes nos interstícios celulares e apenas uma pequena fração atinge os miócitos, tipo de células presentes nos músculos (Perrie et al., 2001). Apesar de ser possível a utilização de DNA nu em vacinas, a produção das proteínas necessárias para o efeito imunológico pode ser insuficiente para garantir uma boa eficácia, necessitando grandes dosagens da vacina.

Neste contexto, os efeitos de adjuvantes estão sendo investigados por vários grupos a fim de obter proteção para o DNA em contato com os fluidos corpóreos e aumentar sua eficiência permitindo, assim, menor dosagem da vacina para que o efeito desejado seja atingido. O ponto máximo a ser atingido é a imunização por tempo prolongado e em dose única. Dentre as várias linhas de pesquisa em adjuvantes para o DNA destacam-se o retrovirus recombinante (Mulligan et al., 1979), adenovirus (Rosenfeld et al., 1991), complexação com lipídios (Welsh et al. 1990, Wang & Huang, 1989), microesferas (Esposito et al., 1999) e incorporação em lipossomas (Perrie et al., 2001). Porém, a utilização de retrovirus e adenovirus é limitada devido a possíveis efeitos oncogênicos (Temin, 1990), favorecendo o desenvolvimento de adjuvantes não virais.

Dentre os adjuvantes não virais os lipossomas e as microesferas poliméricas apresentam-se mais promissores que a simples complexação lipídica

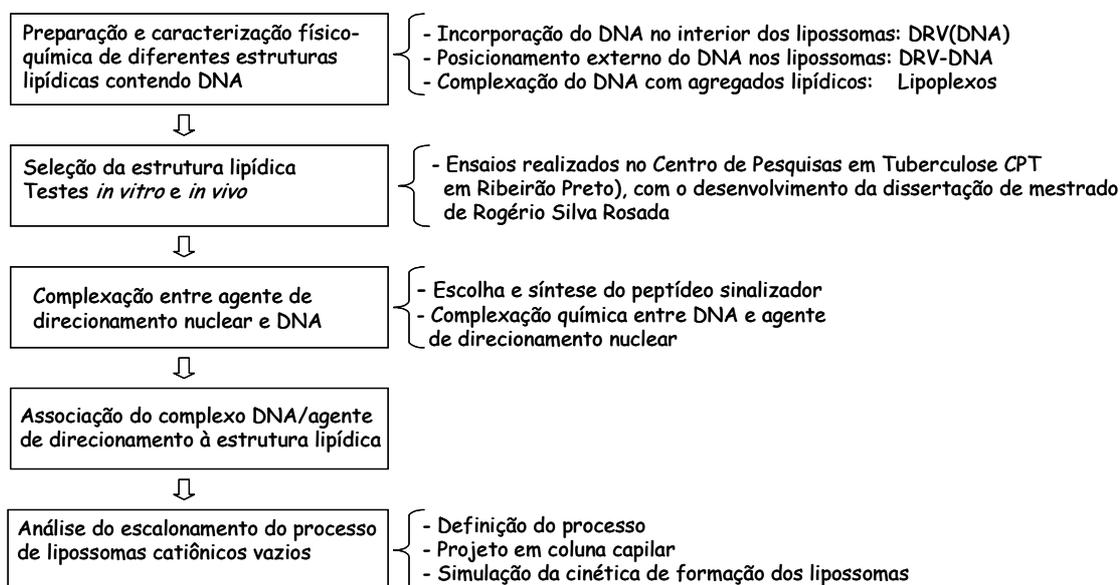
(lipoplexos) pelo maior controle da incorporação do DNA no seu interior, permitindo maior proteção e pela maior flexibilidade e controle que essas estruturas oferecem para o acoplamento na superfície de compostos que aumentam a eficiência de transfecção. Além disso, a facilidade de interação com as células é uma característica intrínseca das estruturas lipídicas, devido à sua semelhança com a membrana celular.

No âmbito das pesquisas no campo do DNA, a produção e caracterização de estruturas lipídicas projetadas para incorporar DNA e aumentar a eficiência de transfecção, proposta neste trabalho, contribuirá de modo geral para o desenvolvimento de vacinas gênicas lipossomais e, de modo particular, para a terapia da tuberculose.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a preparação e caracterização de estruturas lipídicas projetadas para aumentar a eficiência de transfecção do DNA, para avaliação *in vitro* e *in vivo* dos seus efeitos na imunização, visando a produção de vacina gênica para a tuberculose.

A abordagem do assunto foi realizada através das principais etapas indicadas no diagrama:



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DNA plasmideal

O ácido desoxirribonucléico (DNA) faz parte da família dos nucleotídeos, que se caracterizam por possuírem uma base nitrogenada ligada a um açúcar com pelo menos um grupo fosfato. Nesta classificação, a molécula de DNA é um ácido nucléico, pois nada mais é que um polímero composto por unidades monoméricas de nucleotídeos, denominados desoxirribonucleotídeos (Figura 1). Estes monômeros estão ligados através de ligações fosfodiéster, onde o fosfato é esterificado a duas moléculas de pentose nas posições 3'e 5' (Lehninger et al., 1993).

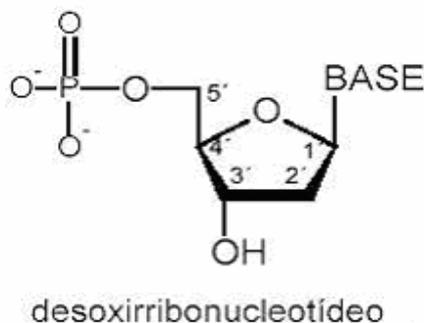


Figura 1: Estrutura dos desoxirribonucleotídeos.

(adaptado de <http://ocean.otr.usm.edu/~leleuter/organic/nucleicacids.html>, 2004)

As bases nitrogenadas são moléculas planares, aromáticas e heterocíclicas derivadas de uma purina ou pirimidina. Para o DNA, as bases nitrogenadas presentes são a adenina (A) e a guanina (G) (derivadas da purina) e a timina (T) e citosina (C) (derivadas da pirimidina) (Lehninger et al., 1993). A Figura 2 apresenta as estruturas esquemáticas das bases nitrogenadas.

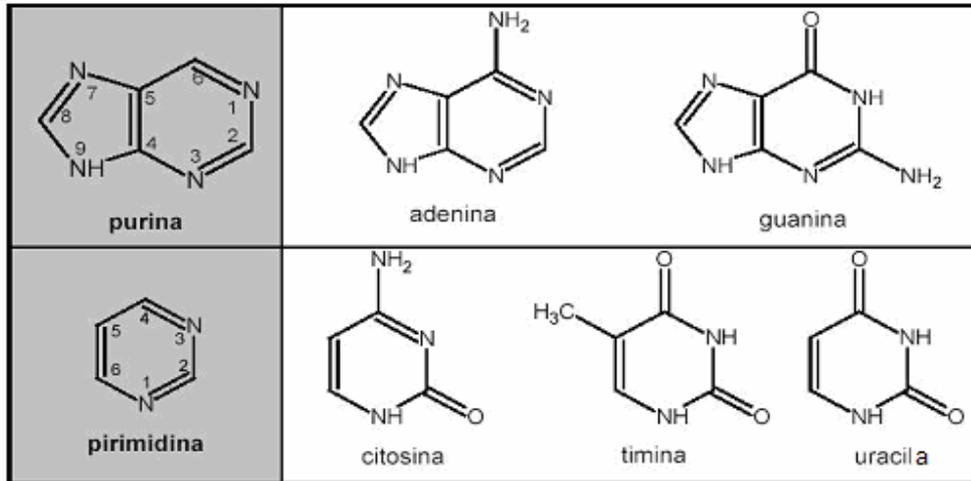


Figura 2: Bases nitrogenadas. As bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA são adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) (Adaptado de Lehninger et al., 1993).

Um fato bastante interessante, descoberto na década de 50, refere-se às quantidades de resíduos de adenina e timina serem idênticas, o mesmo ocorrendo para as quantidades de citosina e guanina. Esta curiosidade foi denominada regra de Chargaff. Já em 1953, Watson & Crick elucidaram a estrutura tridimensional da molécula de DNA, conforme descrito a seguir:

- O DNA consiste de duas cadeias enroladas em torno da mesma direção axial (Figura 3a);
- As duas cadeias estão unidas devido às ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (Figura 3b);
- As ligações de hidrogênio são estabelecidas por pares formados por uma purina e uma pirimidina, coincidindo com a regra de Chargaff (Figura 3c).

A partir do sequenciamento das bases nitrogenadas de uma das cadeias de DNA, é possível identificar a seqüência da cadeia correspondente, pois esta é complementar: adenina de uma cadeia corresponde à timina de outra e guanina

de uma cadeia corresponde à citosina de outra. De modo geral, uma seqüência apropriada de bases nitrogenadas é a própria codificação celular para desencadear todo o processo de síntese da proteína correspondente.

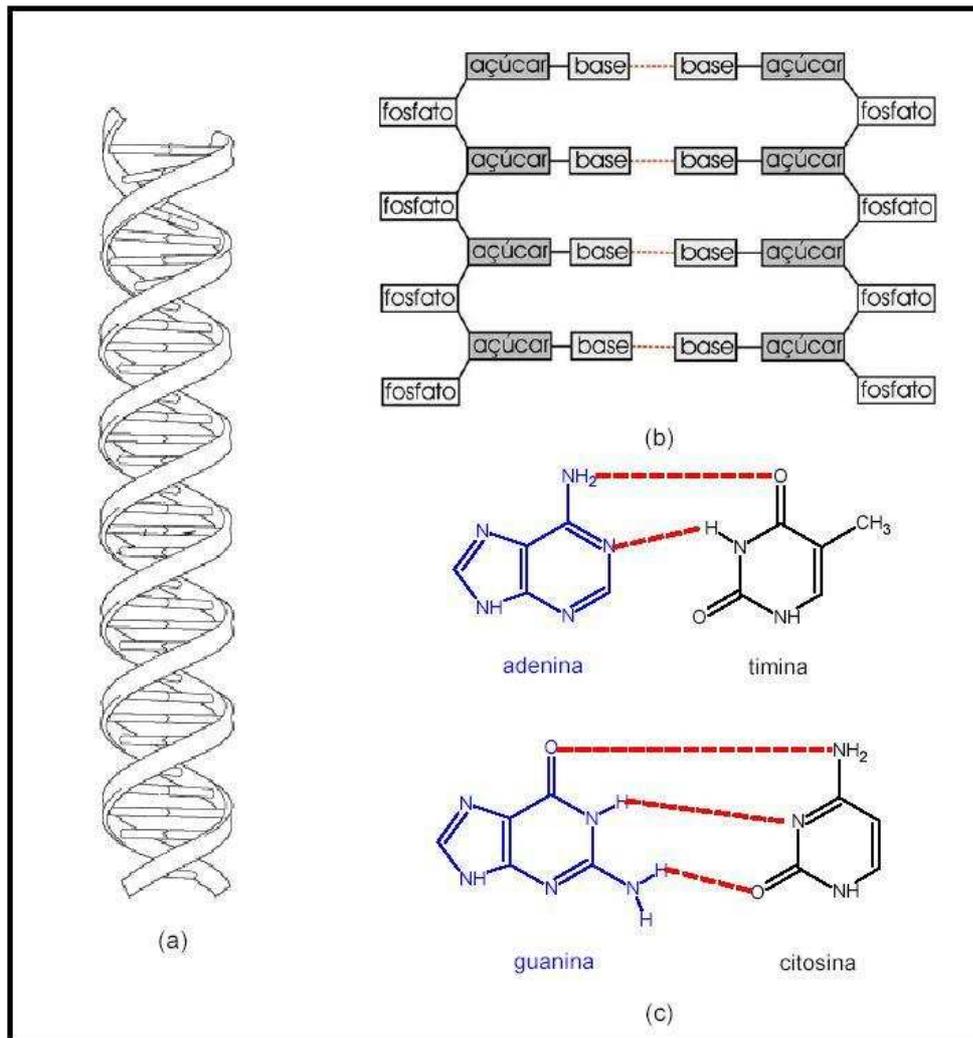


Figura 3: Modelo da molécula de DNA proposto por Watson & Crick, 1953. a) A molécula de DNA consiste em duas cadeias enroladas na mesma direção axial. b) Ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. c) Ligações de hidrogênio entre adenina-timina e guanina e citosina. (adaptado de http://whyfiles.org/126dna_forensic/images/dna.gif, 2004)

O DNA genômico está presente no núcleo celular e é responsável por manter toda a codificação genética da célula. Porém, microorganismos podem conter DNA extracromossômico circular, denominado plasmídeo, que é bem menor que o cromossômico (variam entre 1 e 10.000 pares de bases –bp) , possuem capacidade de replicação autônoma e não é essencial para a sobrevivência das bactérias que os abriga. Estes plasmídeos podem conferir diferentes características genéticas aos seus hospedeiros como, por exemplo, a resistência a determinado antibiótico e determinados tipos de metais (mercúrio, por exemplo). Normalmente estas características não estão ligadas ao cromossomo bacteriano, a não ser que o plasmídeo se incorpore ao mesmo. Existem ainda plasmídeos que estão presentes no interior da bactéria em estado autônomo, integrado ou variando sua condição de forma reversível (Borsani, 2001).

As características dos plasmídeos, descritas anteriormente, tornam-os muito interessantes para a utilização na área de engenharia genética, pois estes podem ser utilizados como vetores para a clonagem de genes ou para o uso como vacina e terapia gênica. Através da tecnologia do DNA recombinante, genes de interesse podem ser inseridos na estrutura circular destes vetores, objetivando a produção de proteínas com ação terapêutica ou de interesse tecnológico.

3.2. Vacinas gênicas ou de DNA

A vacina gênica é composta de uma porção do DNA genético do agente causador da doença que codifica um antígeno imunogênico, com potencial de induzir resposta imune adequada, protetora e duradoura. Este DNA pode ser veiculado em um vetor como, por exemplo, um determinado tipo de plasmídeo. Esse DNA cria condições para a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado representando, atualmente, uma nova estratégia para o combate a doenças infecciosas para as quais ainda não se tem prevenção

segura, como herpes, AIDS, malária, hepatite, esquistossomose, dengue, tuberculose, etc (Silva, 1998, 1999, 2000).

O mecanismo de imunização consiste basicamente das seguintes etapas: (i) administração geralmente por via intramuscular da vacina, (ii) transporte da mensagem genética para o interior dos miócitos e/ou outros tipos de células, (iii) síntese do antígeno como se fosse uma proteína viral, (iv) processamento dos antígenos através de enzimas e transporte dos fragmentos resultantes para a superfície das células apresentadoras de antígenos (APC), (v) reconhecimento pelos linfócitos T CD4 e CD8, responsáveis pela ação imunológica (Lowrie et al., 1997, Silva, C.L., 1995). Os antígenos sintetizados podem ainda, ser secretados e capturados por células derivadas da medula óssea ou podem interagir com imunoglobulinas situadas na superfície dos linfócitos B. Portanto, a vacina de DNA pode estimular tanto a resposta imune celular, importante na eliminação dos patógenos intracelulares, quanto a resposta imune humoral, caracterizada pela produção de anticorpos (Silva, 1995, 1998, 1999, 2000; Lowrie et al., 1997).

Desta forma, uma vantagem no uso da vacina gênica é a possibilidade de sua utilização também na terapia, diferentemente do uso das vacinas convencionais, que são utilizadas somente como prevenção à instalação da doença. Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento dessa vacina com atividade terapêutica contra a tuberculose são inúmeros: segurança, eficácia, pode ser dada numa única dose, estímulo amplo da resposta imunológica, efeito protetor duradouro e pode contribuir significativamente para a diminuição da incidência dessa doença. Além disso, o custo de produção em larga escala é baixo e são estáveis à temperatura ambiente. Todos esses fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunização em regiões de difícil acesso, sendo absolutamente desejáveis no âmbito da realidade brasileira.

3.3. Adjuvantes lipídicos

O processo de transfecção não viral baseado na utilização de lipídios como adjuvantes, encontra atualmente duas linhas distintas de pesquisa: a primeira e bastante estudada é liderada por Huang e envolve a complexação direta dos lipídios com DNA, formando estruturas agregadas designadas na literatura como lipoplexos. A segunda, mais recente, defendida por Gregoriadis, considera a incorporação do DNA em estruturas lipossomais (agregação em bicamadas e estruturas aproximadamente esféricas).

3.3.1. Lipoplexos

Uma das considerações principais desta tendência de pesquisa é a dificuldade de encapsulação do DNA em lipossomas, devido ao tamanho do plasmídeo, causando baixa eficiência de transfecção. Assim, lipídios catiônicos passam a ser utilizados para neutralizar as cargas negativas dos plasmídeos, garantindo sua captura e liberando o DNA mais eficientemente no interior das células (Ropert, 1999 e Felgner et al., 1987). Além disso, a complexação pode formar uma cobertura lipídica, protegendo o DNA das agressões do meio biológico. Desta forma, diversos lipídios catiônicos podem ser sintetizados, constituindo importantes vetores não virais de transfecção (Patel, 2001). Além da interação eletrostática entre lipídios catiônicos e DNA, também ocorre a condensação do DNA, favorecendo a incorporação do lipoplexo pelas células (Gao & Huang, 1995). Lipídios que possuem grupo amina e quaternário de amônia são atualmente os mais utilizados como vetores de transfecção (Gao & Huang 1995, Deshmuh & Huang, 1997, Miller, 1998). Vale ressaltar que uma grande gama de lipídios utilizados nos lipoplexos não se agrega em estrutura de bicamada.

A formação do complexo consiste basicamente na incubação do lipídio, mistura de lipídios ou lipossomas de características catiônicas previamente preparados (dissolução em fase orgânica, evaporação e re-suspensão em fase aquosa) com o DNA. Lipídios neutros, denominados “*helpers*”, também podem ser

utilizados juntamente com os catiônicos para auxiliar a transfecção. A formação dos lipoplexos é cineticamente controlada e, através de microscopia eletrônica, pode-se verificar que variando o tempo de incubação, concentração de DNA e tipo de lipídio, vários tipos de estruturas podem ser obtidas (Sternberg et al., 1994), como estruturas multilamelares internalizando o DNA e o arranjo hexagonal (Koltover et al., 1998). A produção dos lipoplexos em larga escala é difícil de ser controlada e pode resultar na precipitação dos complexos (Lasic, 1997).

Apesar da afinidade do lipoplexo com a membrana celular, o nível de resposta imunogênica não é tão alto como no caso de vetores virais, possivelmente devido principalmente à baixa especificidade da estrutura com relação ao núcleo da célula (Li et al., 1999, Yew, 1999). Por outro lado, estes lipoplexos também são instáveis na presença de soro, dificultando sua aplicação *in vivo*. Yang & Huang, 1997 identificaram que o aumento da razão de cargas lipídio catiônico/DNA inibe o efeito dos componentes do soro na desestabilização do DNA, devido à saturação produzida pelo excesso de carga, permitindo que a maior parte do lipoplexo atinja as células. No entanto, a maior proporção de lipídio catiônico aumenta a toxicidade celular (Lasic, 1997).

A avaliação da transfecção *in vivo*, utilizando colesterol ou o lipídio neutro L- α -dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) em formulações contendo o lipídio catiônico 1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano (DOTAP), mostrou que o colesterol apresentou melhor eficácia de transfecção, possivelmente por criar uma estrutura cristalina mais ordenada, podendo aumentar a estabilidade dos complexos quando expostos ao soro (Crook et al., 1998). Resultados contraditórios foram obtidos por Li et al., 1999 na transfecção através da aplicação intravenosa em ratos, mostrando a superioridade do DOPE em relação ao colesterol. Estudos posteriores mostraram que a eficiência de transfecção depende do binômio lipídio catiônico e “helper” (Regelin et al., 2000).

3.3.2. Lipossomas

Lipossomas, ou vesículas de fosfolipídios, são agregados de fosfolipídios em estruturas de bicamada, contendo um volume aquoso central circundado por uma ou várias lamelas concêntricas formando partículas unilamelares ou multilamelares, com diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. Durante sua formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que se encontram dispersos. A bicamada é capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas e comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material encapsulado no volume aquoso das vesículas (Lasic, 1993; Crommelin & Schereier, 1994). Comparados aos outros sistemas de liberação sustentada tais como géis e matrizes poliméricas, os lipossomas, além de proteger as moléculas da degradação e produzir liberação sustentada do material encapsulado, são biodegradáveis, não tóxicos, não imunogênicos e capazes de interagir melhor com as células, pela similaridade de composição das suas membranas. A produção de lipossomas pode ser feita de maneira controlada e reprodutível por métodos que permitem o escalonamento do processo.

Lipossomas catiônicos são usados para o transporte de genes, para facilitar a transfecção. Esses lipossomas podem conter somente o lipídio catiônico ou sua mistura com lipídios neutros, como o DOPE e colesterol. Inicialmente usou-se a estearilamina como lipídio catiônico; porém, os estudos não prosseguiram devido à sua toxicidade. Atualmente vários outros lipídios catiônicos foram produzidos, dentre os quais os sais quaternários de amônio, como o DDAB (brometo de dimetildioctadecil amônio), DOTAP (1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano) e DODAP (1,2-diacil-3dimetilamônio-propano) são os mais usados pelos seus efeitos benéficos na transfecção. Em geral a estrutura desses anfífilicos por si só não favorece a formação de bicamadas e sua associação com lipídios estruturais é imprescindível para a formação dos lipossomas.

Vários kits para transfecção constituídos de lipídios catiônicos são disponíveis comercialmente. Exemplos típicos são: “Lipofectin” (DOTMA/DOPE) (DOTMA refere-se a cloreto de dioleoxipropiltrimetilamônio), “Lipofectamine”

(DOSPA/DOPE) (DOSPA refere-se ao lipídio 2,3 dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio), “Lipofectace” (DODAB/DOPE) (DODAB refere-se a brometo de dioctadecil dimetilamônio), etc. Nesses kits, as concentrações de lipídios nas soluções são baixas, não permitindo a suspensão de DNA em concentrações suficientes para transfecção *in vivo* (Lasic, 1997). Por outro lado, as estruturas são identificadas como lipossomas; porém, devido à instabilidade dos lipídios catiônicos anteriormente relatada, pode-se antever que nem sempre essas estruturas estão presentes.

A maioria dos estudos relatados na literatura foi realizada com o DNA associado à superfície externa dos lipossomas. O tamanho do DNA era reportado na literatura como o principal problema para a sua encapsulação em lipossomas. (Ropert, 1999 e Felgner et al., 1987), Recentemente, Perrie et al. 2001, obtiveram alta eficiência de encapsulação do DNA em lipossomas catiônicos, com nível de incorporação entre 88 e 97%, através da técnica desidratação-rehidratação (DRV), em condições controladas. Os lipossomas produzidos foram designados por DRV(DNA). A utilização de DNA rádiomarcado demonstrou sua localização nos espaços interlamelares e o diâmetro dessas vesículas (aproximadamente 1µm) foi bem menor comparado àquelas contendo o DNA na superfície (10-20 µm), obtidos pela complexação entre DRVs vazios e DNA. Os níveis de encapsulação do DNA em lipossomas catiônicos não são influenciados pela quantidade de lipídio catiônico nem de lipídio neutro. Porém, o aumento da proporção de lipídio catiônico, resulta em lipossomas de menor diâmetro, pois durante a desidratação-hidratação as superfícies carregadas repelem-se mutuamente interferindo na fusão.

Gregoriadis et al. (1997, 1999 e 1999) verificaram que a encapsulação do plasmídeo pRc/CMV HBS, que codifica a expressão de antígeno para hepatite B, em lipossomas apresentou melhor resposta imunológica, quando comparado ao “naked” DNA e ao DNA complexado em lipossomas. A encapsulação promove a proteção do DNA da degradação por nucleases, e do ataque de moléculas aniônicas que podem agir competitivamente deslocando o DNA da superfície dos lipossomas ou dos lipoplexos (Gregoriadis et al. 1996, Perrie & Gregoriadis, 2000).

Uma avaliação de vários fosfolipídios na resposta imunológica, *in vivo*, de DRV(DNA) revelou que a presença de DOPE ou EPC/PE (onde EPC é L- α -fosfatidilcolina de ovo) como fosfolipídios neutros é importante para a potencialização da resposta imunológica. A importância do DOPE nos estudos de potencialização de transfecção *in vitro* com lipoplexos já é bastante conhecida (Tomlinson et al., 1996, Farhood et al., 1995, Felgner et al., 1994 e Wrobel & Collins, 1995), pois este fosfolipídio possui a capacidade de passar para a fase hexagonal H_{II}, facilitando o rompimento da membrana endossomal. Fosfolipídios com elevada temperatura de transição de fases, como é o caso do lipídio estrutural distearoilfosfatidilcolina (DSPC), diminuem a transfecção, pois tornam a bicamada mais rígida, reduzindo a eficiência de interação com a membrana endossomal. Duzgunes et al. (1989) demonstraram a existência de uma correlação direta entre fluidez da bicamada e a transfecção.

Do exposto pode-se concluir que formulações lipossomais com maior eficiência para o transporte de genes, devem conter três componentes lipídicos funcionais:

- (i) Lipídios estruturais, que garantem a formação da bicamada e agregação lipossomal. Um representante desta categoria é a L- α -Fosfatidilcolina de ovo (EPC), de origem natural e composta por uma mistura de fosfolipídios com ácidos graxos variados, de cadeias saturadas 16:0 (34%) e 18:0 (11%) e insaturadas 16:1 (2%), 18:1 (32%), 18:2 (18%), 20:4 (3%) (<http://www.avantilipids.com>, 2004). A Figura 4 apresenta graficamente a distribuição de ácidos graxos presentes na fosfatidilcolina natural de ovo, mostrando que as maiores proporções referem-se ao ácido graxo saturado com 16 átomos de carbono (16:0) e mono-insaturado com 18 átomos de carbono (18:1). A Figura 5 apresenta uma molécula do tipo C(16):C(18:1 Δ^9)PC, de cadeias *sn*-1 e *sn*-2 de comprimentos diferentes, típica e presente na composição do PC de ovo.

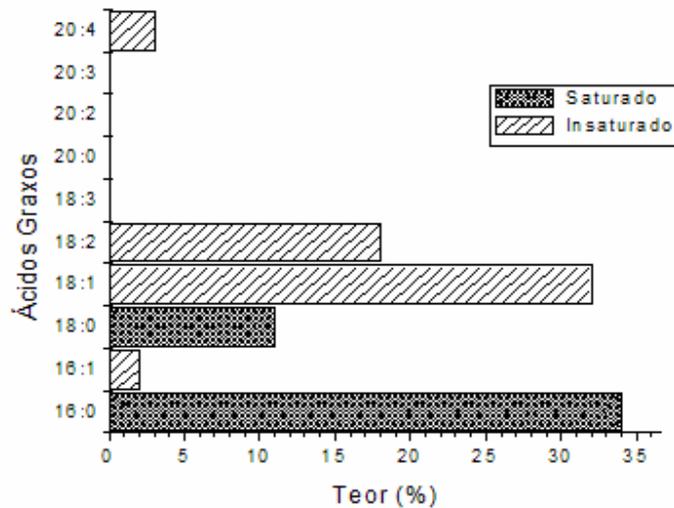


Figura 4: Distribuição de ácidos graxos existentes na fosfatidilcolina natural de ovo (<http://www.avantilipids.com>, 2004).

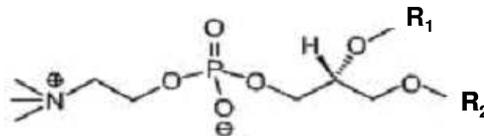


Figura 5: Estrutura molecular característica de uma molécula de fosfatidilcolina. R_1 e R_2 , nas posições *sn*-1 e *sn*-2 correspondem a cadeias acila de diferentes comprimentos e graus de insaturação (Figura 4).

(ii) Lipídios com característica catiônica para complexação com DNA, citando como exemplo o lipídio monocatiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). A Figura 6 apresenta a estrutura química deste lipídio.

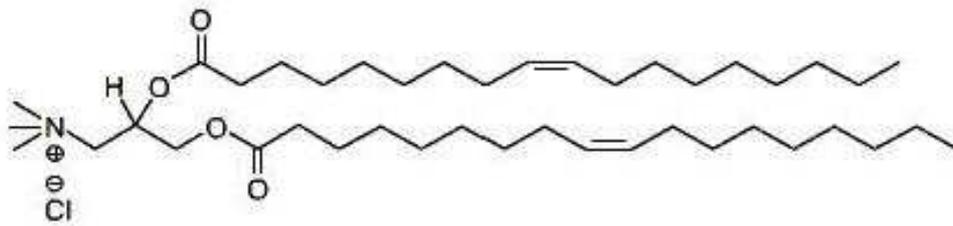


Figura 6: Estrutura molecular correspondente ao lipídio monocatiônico, cloreto de 1,2-dioleoil-3-Trimetilamônio-Propano (DOTAP).

(iii) Lipídios “helpers” ou co-lipídios, citando como exemplo 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). A Figura 7 apresenta a estrutura química deste lipídio.

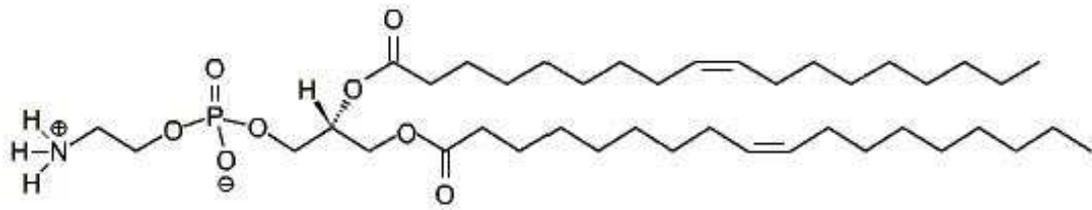


Figura 7: Estrutura molecular do co-lipídio ou “helper” 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

3.3.3. Razão entre cargas

Muitos estudos tentavam relacionar parâmetros biofísicos com a razão mássica entre DNA e lipídios catiônicos; porém como a natureza da interação é basicamente eletrostática (Zuidam & Barenholtz, 1998), torna-se interessante elaborar uma relação entre as cargas negativas e positivas envolvidas. Rädler et al. (1998) introduziram o parâmetro razão entre cargas ($R_{+/-}$), relacionando moles de cargas positivas, provenientes das cabeças polares carregadas positivamente dos lipídios catiônicos e moles de cargas negativas de grupamentos fosfato presentes no esqueleto da molécula de DNA, conforme a Equação 1.

$$R_{+/-} = \left(\frac{M_{L^+}}{MW(L^+)} \right) \left(\frac{MW(bp)}{2M_{DNA}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

onde,

$R_{+/-}$: Razão entre cargas;

M_{L^+} : Massa de lipídio catiônico (mg);

M_{DNA} : Massa de DNA (mg);

$MW(L^+)$: Massa molar do lipídio catiônico;

$MW(bp)$: Massa molar média de um par de bases.

De acordo com esta definição, o valor de $R_{+/-}=1$ corresponde à neutralidade estequiométrica entre cargas.

3.4. Processo de transfecção

Para que a transfecção *in vitro* envolvendo adjuvantes lipídicos catiônicos ocorra com sucesso e permita que os processos celulares de tradução e transcrição para a síntese da proteína codificada ocorram, três sub-processos devem acontecer (Chesnoy & Huang, 2000). Estes sub-processos são: (i) internalização do complexo lipídico na célula; (ii) liberação do DNA no citoplasma; (iii) entrada do DNA no núcleo celular. Cada um destes itens será descrito a seguir.

3.4.1. Internalização do complexo lipídico para o citoplasma

O primeiro sub-processo consiste na ligação do DNA à membrana celular que é carregada negativamente. Assim, na ausência de um ligante específico, a força motriz para a ligação do lipoplexo é a atração eletrostática. Acredita-se que a variação de eficiência entre os vários tipos de lipoplexos está relacionada às suas propriedades físicas, como tamanho, estabilidade e densidade de cargas. A

transfecção *in vitro* mostrou-se mais eficiente para complexos com maior proporção de carga positiva. Labat-Moleur et al. (1996) e Zhou & Huang (1994) identificaram que a internalização do complexo ocorre principalmente por endocitose.

3.4.2. Liberação do DNA para o citoplasma

O segundo sub-processo refere-se à liberação do DNA no citoplasma: o DNA é liberado no citosol a partir dos endossomas, possivelmente por ruptura da membrana endossomal (Zhou & Huang, 1994) que se desestabiliza devido a interações entre lipídios catiônicos e moléculas aniônicas presentes nesta membrana (Wattiaux et al., 1997). De acordo com Xu & Szoka, 1996, a desestabilização da membrana endossomal resulta em um “flip-flop” de seus lipídios aniônicos, predominantemente presentes na monocamada que interfaceia o citoplasma. Estes lipídios aniônicos difundem-se para o complexo (lipídio catiônico/DNA) e formam pares de íons com carga neutra com os lipídios catiônicos, liberando o DNA no citoplasma. Este mecanismo que envolve o primeiro e segundo sub-processos pode ser ilustrado através da Figura 8, onde quatro etapas são identificadas:

- ETAPA 1: O complexo lipossoma catiônico/DNA é endocitado após interações eletrostáticas com a membrana celular.
- ETAPA 2: O complexo inicia a desestabilização da membrana endossomal através do flip-flop dos lipídios aniônicos que estão localizados predominantemente na face citoplasmática da membrana endossomal.
- ETAPA 3: Os lipídios aniônicos difundem-se para o complexo DNA/lipossoma e formam pares iônicos neutros com os lipídios catiônicos do lipossoma, desestabilizando a membrana endossomal.
- ETAPA 4: A desestabilização da membrana endossomal permite que o DNA difunda livremente para o citoplasma.

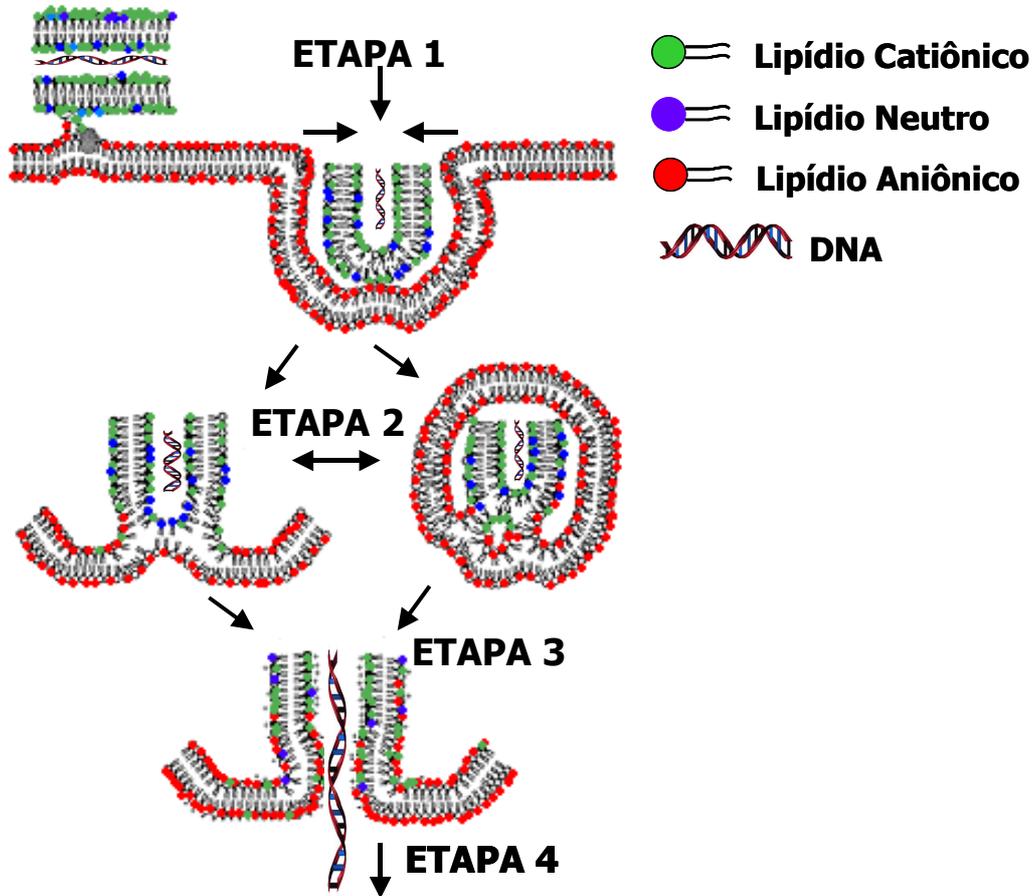


Figura 8: Mecanismo de liberação do DNA do complexo DNA/lipossoma catiônico (Xu & Szoka, 1996). ETAPA 1: Endocitose do complexo lipossoma catiônico/DNA. ETAPA 2: "Flip-flop" dos lipídios aniônicos presentes na membrana endossomal desestabilizam o endossoma. ETAPA 3: Formação de pares iônicos neutros entre lipídios catiônicos e aniônicos. ETAPA 4: Difusão do DNA para o citoplasma (Adaptado de Xu & Szoka, 1996).

Apesar do "flip flop" desestabilizar a membrana endossomal, nem sempre o grau de desestabilização produz transfecção eficiente. Uma alternativa para intensificar a ação dos lipossomas catiônicos é o emprego de outros compostos que facilitem a desestabilização da membrana endossomal. Dentro dessa estratégia as fosfatidiletanolaminas (PEs) são os principais representantes de compostos facilitadores, também designados como "helpers" nos processos de transfecção com lipossomas catiônicos e que possuem características fusogênicas

(Felgner et al., 1994, Zabner et al., 1995, Farhood et al., 1995). A fusão provocada pelas PEs não ocorre diretamente com a membrana citoplasmática, sendo necessário que o caminho da endocitose seja seguido (Wrobel & Collins, 1995). Farhood et al., 1995, utilizaram um agente lisosomotrópico, a cloroquina, conhecida por interromper a endocitose, através da elevação (neutralização) do pH endossomal e lisossomal e constataram que a atividade de transfecção de lipossomas catiônicos contendo DOPE ou DOPC (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina, o qual não forma fase hexagonal inversa em condições fisiológicas) foi inibida, indicando que a endocitose é um caminho necessário para a atividade de lipossomas que contém este tipo de “helper”.

Fosfatidiletanolaminas, PEs, constituem uma classe de lipídios com comportamento polimórfico, e quando dispersos em condições fisiológicas, têm sua agregação favorecida (menor energia) na fase hexagonal inversa. Esta característica deve-se ao fato que as PEs possuem área da cabeça polar pequena em relação à área ocupada pelas cadeias acila, que proporciona uma estrutura molecular na forma cônica (cone truncado), que, por razões geométricas favorece o empacotamento da estrutura agregada na fase hexagonal inversa, H_{II}. Além disso, a pequena área ocupada pela cabeça polar também é influenciada por pontes de hidrogênio entre os grupos amina de PEs adjacentes, que reduzem sua hidratação. No entanto, a formação da fase lamelar pode ser verificada com PEs em situações nas quais o pH é elevado (acima de 8-9), quando o grupo amônia está desprotonado e a cabeça polar está carregada negativamente, sendo a fase lamelar resultado de efeitos eletrostáticos repulsivos entre as cabeças polares adjacentes, como consequência da redução das pontes de hidrogênio (Litzinger & Huang, 1992). Outra situação de formação de fases lamelares com PEs é através da adição de um segundo componente ao PE capaz de estabilizar a estrutura em bicamada. Esta última estratégia evita as condições extremas de pH citadas anteriormente e é fundamental para a preparação de lipossomas em condições fisiológicas. Neste caso, a capacidade de transição de fases das PEs em lipossomas depende da temperatura e da capacidade de modificação das

propriedades dos outros componentes da bicamada com as condições ambientais, que conduzem à desestabilização da estrutura.

3.4.3. Entrada do DNA no núcleo celular e direcionamento nuclear

O terceiro sub-processo refere-se à entrada do DNA no núcleo da célula para que ocorra a expressão de proteínas. Embora a transferência do plasmídeo para o citoplasma seja mais discutida, o seu direcionamento para o núcleo das células é ainda obscuro. Chesnoy & Huang, 2000 sugerem que para isso acontecer o DNA deva estar livre de lipídios. Resultados obtidos através de microinjeção direta de lipoplexos no núcleo mostraram baixa eficiência de expressão proteica (Zabner et al., 1995). Lasic, 1997 sugere que a inserção do DNA no núcleo da célula é favorecido pela utilização de DNA específico (associado a ligantes) ao invés do direcionamento dos veículos de liberação. Nos processos naturais existem proteínas capazes de trafegarem através da membrana nuclear, que certamente contêm seqüências de aminoácidos que promovem o direcionamento específico. Se estas proteínas possuíssem domínios que podem ligar a ácidos nucleicos, seria possível a entrada do DNA no núcleo. Polilisina, protamina e histonas são capazes de complexar o DNA em uma estrutura condensada, além de protegê-lo de possíveis degradações. A conformação (condensada, supercondensada ou relaxada) mais apropriada do DNA para a entrada no núcleo ainda não é conhecida. Apesar dessas características, a utilização isolada destes polipeptídios não potencializa a transfecção, demonstrando que a presença do veículo lipídico é importante para a interação do complexo com a membrana celular (Zhou & Huang, 1994). Os íons Ca^{2+} também tem demonstrado efeito potencializador das propriedades de transfecção de complexos catiônicos lipídio/DNA (Lam & Cullins, 2000), possivelmente devido ao aumento da taxa de endocitose (Zaitsev et al., 1997) ou por facilitar a liberação endossomal (Haberland et al., 1999).

Lipossomas catiônicos são vetores eficientes para a internalização do DNA plasmídeo (pDNA) nas células e subsequente liberação no citoplasma; porém, esta não é a última etapa da transfecção, pois o plasmídeo ainda deve trafegar

através do citoplasma e atingir o núcleo celular para que a expressão gênica da proteína ocorra. Felgner et al. (1987) demonstraram esta situação através da injeção direta de plasmídeos no núcleo de células L timidina-quinase negativa de ratos, onde foi possível observar que 50-100% das células expressaram atividade timidina-quinase. Quando a injeção foi realizada no citoplasma celular, não se verificou atividade alguma. O plasmídeo rádiomarcado penetrou eficientemente no citoplasma celular; porém, somente frações menores de 1% foram encontradas no núcleo. Estas investigações mostram que a tecnologia de incorporação do plasmídeo (pDNA) no interior do citoplasma tem sido extensamente estudada, porém o tráfego para o interior nuclear ainda é pouco conhecido.

Células eucarióticas que se encontram em fase de divisão celular (final da pró-fase e começo da pró-metáfase) caracterizam-se por apresentar a membrana nuclear (ou envelope nuclear, NE) desorganizada, permitindo que o pDNA atinja o núcleo facilmente. Porém, quando o NE está intacto (célula não está em fase de divisão), este funciona como uma barreira para macromoléculas, conseqüentemente, limitando a entrada do plasmídeo no núcleo.

O NE possui poros que permitem o transporte de moléculas pequenas e íons através de difusão passiva, enquanto macromoléculas necessitam de processo altamente específico, com a presença de determinadas proteínas (Munkonge et al., 2003). Quando pequenos nucleotídeos (ODNs, 18-20 bp) são transfectados, identifica-se um acúmulo rápido no núcleo (Bennett et al., 1992 e Chin et al., 1990); porém, o limite para o transporte passivo destas moléculas é de 200 a 310 bp (Ludke et al., 1999). Lange et al. (1986) identificaram que o limite de massa para difusão de moléculas através do poro nuclear é 40.000 Da, indicando que plasmídeos maiores são excluídos. Além disso, ácidos nucleicos não possuem direcionador ou sinalizador nuclear e, desta forma, não conseguem trafegar através dos poros nucleares como moléculas livres. A utilização de direcionadores específicos ou sinais direcionadores para o núcleo (NLSs) através de sua conjugação com o pDNA pode ser uma alternativa para superar a barreira do NE (Munkonge et al., 2003).

A Figura 9 apresenta um modelo proposto na literatura para a aplicação de pDNA conjugado com NLS (DNA-NLS) em presença de lipídios catiônicos, objetivando a entrada da estrutura no interior do citoplasma celular e, em seguida, o direcionamento nuclear.

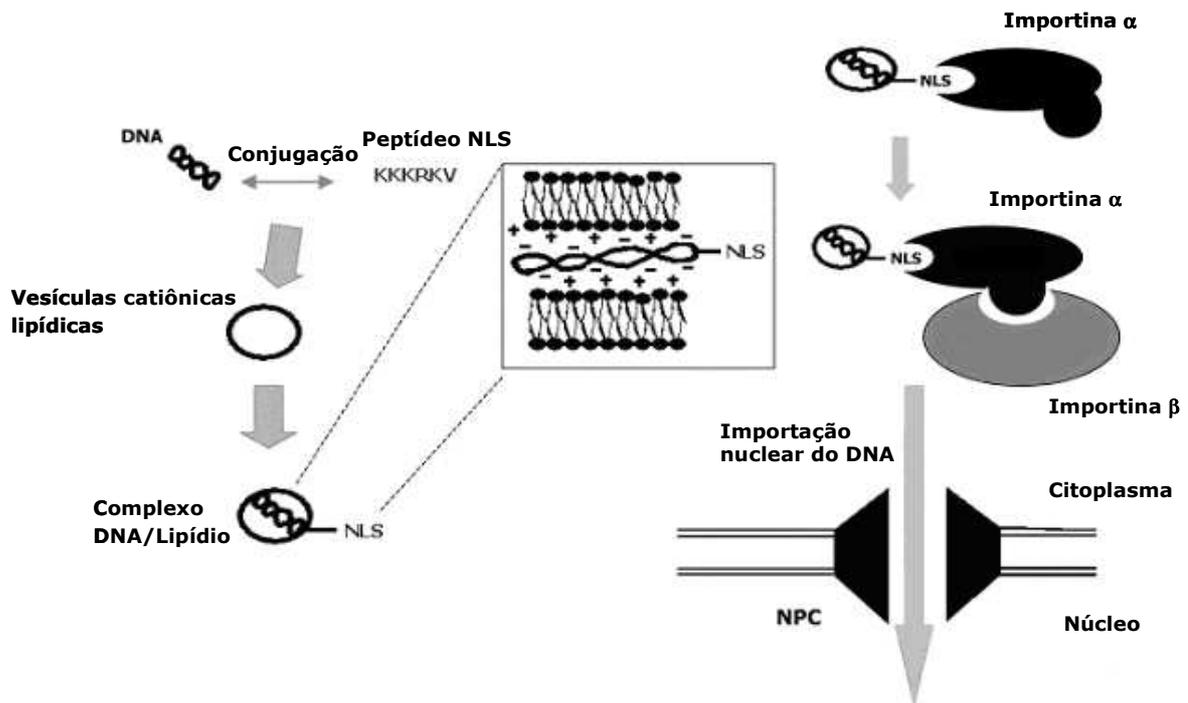


Figura 9: Modelo proposto para a veiculação de DNA para facilitar a internalização no citoplasma celular, através do emprego de lipídios catiônicos e direcionamento nuclear através da complexação do DNA com peptídeos sinalizadores NLS (adaptado de Munkonge et al., 2003).

3.4.3.1. Poro Nuclear e transporte cito-nucleoplasmático

O NE possui canais que podem se expandir e são denominados poros nucleares (complexos formadores de poros nucleares ou NPC). NPCs são estruturas supramoleculares cilíndricas ancoradas no NE e possuem cerca de 130 nm de diâmetro e 70 nm de espessura que transpassa o NE. Os poros nucleares (NPCs) de células de mamíferos possuem cerca de 50 tipos de proteínas únicas (aproximadamente 8 cópias para cada NPC) (Bastos et al., 1995). Filamentos

estão conectados e provavelmente interagem com receptores que trafegam pelo poro e possuem uma extensão de cerca de 50-100 nm tanto para a face citoplasmática como para a nucleoplasmática (Goldberg et al., 1996 e Cordes et al., 1997). A difusão passiva de metabólitos e de pequenas macromoléculas é rápida; porém, proteínas maiores que 20-40 kDa possuem difusão bastante ineficiente. O diâmetro do canal pode se expandir de 10 a 25 nm para permitir a passagem de macromoléculas com dezenas de mega Daltons (próximo a 40 nm de diâmetro) se estas forem “rebocadas” por proteínas específicas (Pante & Kann, 2002). NPCs são organizados em uma rede elástica e são imóveis no plano da membrana nuclear. Tipicamente, uma célula de um organismo mamífero possui cerca de 2000 NPCs a uma densidade de 4 NPCs/ μm^2 (Daigle et al., 2001). A Figura 10 apresenta duas microscopias eletrônicas dos poros nucleares.

A importação seletiva de macromoléculas maiores que 40 kDa é mediada através de sinais direcionadores para o núcleo (NLSs). A rota de importação mais conhecida é através do reconhecimento de NLS pelas proteínas importina α e importina β . Importina α interage diretamente com o NLS conjugado com a macromolécula a ser importada. Uma vez formado o complexo NLS-Importina α , a importina β interage com este complexo e o direciona para o NPC através de ligações específicas, conforme ilustrado na Figura 9.

De modo geral, os ácidos nucleicos necessitam de um promotor para o transporte através do NPC e mesmo elementos altamente compactados e condensados (tipicamente 30-100 nm de diâmetro) não são capazes de difundirem por si só através do NPC. A utilização de direcionadores para o núcleo torna-se, então, imprescindível para elevar a eficiência de transfecção.

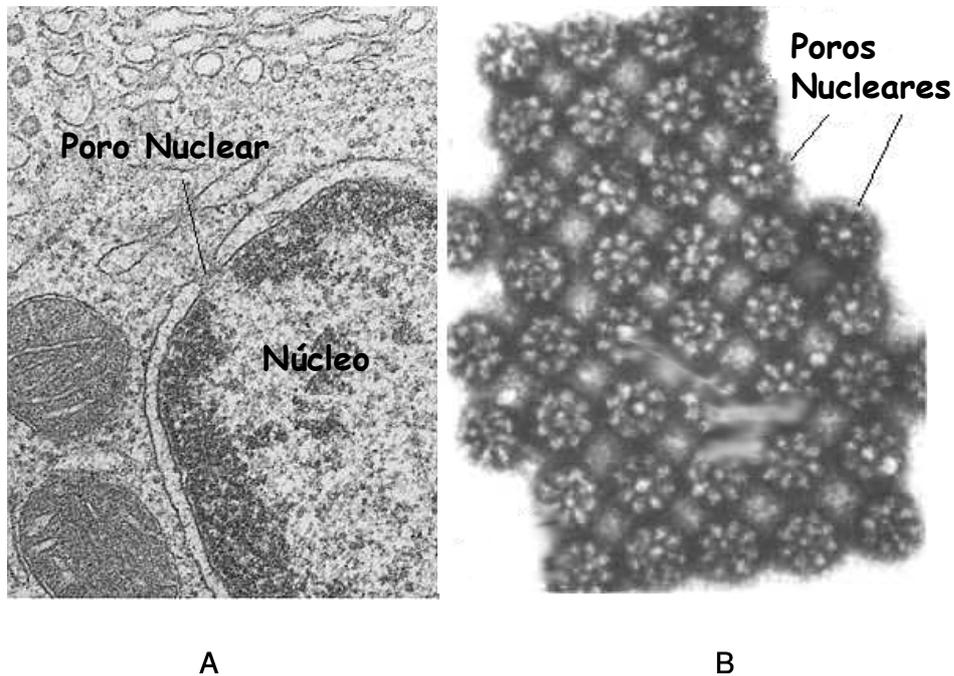


Figura 10: Micrografia obtida a partir de microscopia eletrônica de transmissão indicando os poros nucleares. A). Corte transversal de uma célula indicando o poro nuclear. B) Microscopia eletrônica da superfície do envelope nuclear (NE) (Adaptado de Alberts et al., 1994 e http://cellbio.utmb.edu/cellbio/nuclear_envelope.htm, 2004).

3.4.3.2. Diversidade de sinais direcionadores para o núcleo (NLSs)

NLSs são seqüências de aminoácidos que não sofrem clivagem e que estão contidas em um substrato de transporte. O NLS mais descrito é a seqüência proveniente do *Simian Virus 40 large tumor antigen* (SV40 T) que consiste em uma seqüência de aminoácidos básicos precedidos por um resíduo de prolina (Kalderon et al., 1984). Uma variação desta seqüência é o NLS bipartido, composto por dois conjuntos separados por 9-12 resíduos, exemplificado pelo *Xenopus phosphoprotein nucleoplasmin* (Robins et al., 1991). Ambos NLSs utilizam a importina α como receptor. Uma variação destes NLSs clássicos é a seqüência proveniente da proteína Rev, do vírus tipo H1 da imunodeficiência humana (HIV-1), rica em arginina (Henderson & Percipalle, 1997).

Os NLSs não clássicos são aqueles que não utilizam o sistema importina α e β para o transporte nuclear. Um representante desta categoria é a seqüência M9 da ribonucleoproteína heterogênea nuclear humana hnRNP A1 (responsável pelo empacotamento e transporte do mRNA). M9 é formada por aproximadamente 38 aminoácidos, rico em glicina, localizada entre os resíduos 268 e 305 (de um total de 320 aminoácidos) da proteína hnRNP A1 (Siomi & Dreyfuss, 1995). O transporte através do NPC desta seqüência M9 depende da transportina (proteína carreadora endógena) (Nakielny et al., 1996).

A Tabela 1 apresenta as seqüências de aminoácidos dos NLSs citados anteriormente. A nomenclatura internacional, IUPAC, estabeleceu letras do alfabeto para designar cada um dos aminoácidos apresentados no Anexo I.

Tabela 1: Peptídeos sinalizadores nucleares e seu sequenciamento.

Nome	Peptídeo		Observações
		Seqüência	
SV40 T		P ¹²⁶ KKKRKV	Proveniente do simian virus 40 large tumor antigen
Seqüência proveniente do <i>Xenopus phosphoprotein nucleoplasmin</i>		KRPAATKKAGQAKKKK ¹⁷⁰	Varição do SV 40 T
Seqüência proveniente da proteína Rev, do vírus tipo H1 da imunodeficiência humana (HIV-1)		³⁵ RQARRNRRRRWRERQRQ ⁵¹	rica em arginina
M9		GNQSSNFGPMKGGNFGGRS- SGPYGGGGQYFAKPRNQQG- YGGC	ribonucleoproteína heterogênea nuclear humana hnRNP A1

Dentre os peptídeos sinalizadores, apresentados na Tabela 1, o proveniente do SV 40T já possui atividade NLS comprovada na literatura, além de possuir uma seqüência pequena de aminoácidos, favorecendo sua síntese, sendo

esta, então, uma boa opção para iniciar as investigações sobre os efeitos de direcionamento e transporte nuclear.

3.4.3.3. Conjugação de sinais direcionadores para o núcleo com DNA

Os primeiros trabalhos que empregaram a estratégia de direcionamento nuclear realizaram apenas uma mistura física entre o DNA e o NLS para formar complexos iônicos e, em seguida, realizaram os protocolos convencionais de transfecção. Este procedimento permitiu um aumento significativo da eficiência de transfecção quando estes complexos iônicos eram injetados diretamente no citoplasma celular (Collas et al., 1996, Subramanian et al., 1999).

A conjugação entre DNA e NLS torna-se necessária para que este complexo, uma vez liberado no citoplasma celular, possa ser transportado para o destino (núcleo). A conjugação entre DNA e peptídeos (NLSs) diretamente durante a síntese destas espécies químicas não é possível devido à incompatibilidade dos processos de obtenção destes compostos (Munkonge et al., 2003).

Outra alternativa encontrada de associação direta de peptídeos NLSs com o pDNA é através de conjugação química após a síntese independente de cada espécie. Para que isto ocorra, ambos os constituintes devem ser preparados e purificados separadamente, para a subsequente conjugação, onde são utilizados agentes de *crosslinking* adequados (Tung & Stein, 2000). Porém, a maior desvantagem desta conjugação química está na redução da atividade de transcrição resultante da modificação química das moléculas, além da reação promover a ligação do peptídeo em posições randômicas da molécula de DNA, podendo afetar o segmento específico que codifica a proteína em questão (Munkonge et al., 2003).

Outra estratégia, empregada por Subramanian et al. (1999), para elevar a taxa limitante da transfecção (transporte através da membrana nuclear) é a conjugação de um NLS não clássico (M9) com um peptídeo catiônico derivado da seqüência do SV 40 T. O M9 não possui característica fortemente catiônica e a adição de um segmento catiônico em sua cadeia permite maior interação entre o

M9 e o DNA. Neste ensaio, foi possível obter 83% de transfecção e elevar em 63 vezes a expressão gênica.

Outros estudos também demonstraram que a eficiência da transfecção pode ser elevada quando o peptídeo sinalizador é ligado covalentemente a um componente catiônico com domínios que naturalmente se ligam ao DNA. Algumas das moléculas já estudadas na literatura e que possuem esta propriedade são poli/oligolisina, histona 1 (Chan & Jans, 1999 e 2001) e poliaminas (Hawley-Nelson et al., 2003). As poliaminas, tal como a spermina podem ser ligadas covalentemente durante a síntese química do peptídeo, utilizando para isso carboxispermina que é ligada pelo terminal N do peptídeo (Hawley-Nelson et al., 2003). As poliaminas naturais tais com a spermina e spermidina são moléculas policatiônicas alifáticas presentes no interior de células e estão envolvidas em inúmeras funções (Thomas & Thomas, 2001). Em condições fisiológicas as poliaminas estão carregadas positivamente (spermina com quatro cargas positivas e a spermidina com três) e se tornam o alvo principal de interações com DNA e RNA (Bloomfield, 1991). A interação destes compostos com o DNA ocorre através de mudanças conformacionais ou interações eletrostáticas, facilitando a interação do peptídeo com o DNA (Hawley-Nelson et al., 2003).

O desenvolvimento de peptídeos-ácidos nucleico (PNAs) também possibilita a conjugação química entre estes dois tipos de moléculas de uma maneira seqüencial definida. PNAs são homólogos sintéticos dos ácidos nucleicos que possuem em seu esqueleto uma seqüência de unidades de aminoetil-glicina, substituindo o esqueleto de açúcar do DNA. Este esqueleto pseudo-peptídico promove certa estabilidade e permite muitas variações químicas, permitindo que esta molécula se torne facilmente um ligante para o inserto de segmentos de DNA (Dean, 2000).

As técnicas de conjugação entre DNA e NLS apresentadas anteriormente foram resumidas na Tabela 2, contendo também as principais vantagens e desvantagens.

Tabela 2: Técnicas de conjugação entre DNA e NLS e suas principais vantagens e desvantagens.

Item	Tipo de direcionamento nuclear	Vantagem/Desvantagem
1	Simples mistura física (NLS/DNA)	Se o peptídeo não for fortemente catiônico, não haverá grande interação eletrostática. A seqüência de direcionamento pode estar envolvida na ligação eletrostática e não ficar disponível para mecanismo de transporte.
2	Conjugação química direta (NLS-DNA)	Diminuição da atividade de transcrição e acoplamento do peptídeo ocorre em locais randômicos no pDNA .
3	Utilização de grupo com afinidade natural ao DNA (spermina) NLS-Sp-DNA	Spermina possui afinidade natural com o plasmídeo e pode ser acoplada covalentemente no final da terminação N da seqüência do peptídeo, durante a própria síntese do peptídeo.
4	Acoplar seqüência de peptídeo catiônico ao NLS NLS-Peptídeo catiônico-DNA	Pode-se utilizar rota química para acoplar NLS ao peptídeo catiônico ou realizar a síntese direta deste conjugado (depende do tamanho do peptídeo).
5	Peptídeos-ácidos nucleico PNAs	Modificação do conceito estrutural do plasmídeo. Alteração da estrutura molecular do plasmídeo

3.5. Processos Escalonáveis para Produção de Lipossomas

Vários métodos para preparação de lipossomas têm sido empregados e desenvolvidos, porém, apesar das vantagens sobre outros veículos de liberação sustentada, a utilização de lipossomas na indústria tem sido limitada pela falta de desenvolvimento de processos escalonáveis eficientes de fácil operação e capazes de produzir as estruturas projetadas para aplicações específicas (Gregoriadis, 1993 e Lasic, 1993). Poucos destes procedimentos atendem às exigências da indústria quanto à esterilidade e estabilidade dos lipossomas produzidos e com relação à possibilidade de se realizar aumento de escala e ser simples e reproduzível.

Em escala laboratorial, os métodos convencionais mais utilizados para preparação de lipossomas são o da hidratação de filme lipídico seco, injeção de solventes voláteis e remoção de detergentes. Além dos métodos de produção de lipossomas deve-se também destacar os métodos de incorporação ativo (ou

remoto) e passivo para a encapsulação ou incorporação de substâncias ativas nas estruturas lipossomais.

O método passivo pode ser aplicado a qualquer substância, através da interação do agente a ser encapsulado com a bicamada lipossomal (associação de membrana), pela encapsulação na fase aquosa intralipossomal ou por uma combinação de ambas. Já os métodos ativos baseiam-se na aplicação de um gradiente de pH, potencial de membrana e gradiente de sulfato de amônia, permitindo que a substância ativa seja incorporada na estrutura lipossomal. Uma outra metodologia para a incorporação remota de bioativos em lipossomas é o uso de vesículas lipídicas compostas de anfífilos catiônicos que formam estruturas com poli ou oligonucleotídeos para liberação gênica (Barenholz & Lasic, 1996).

Outra forma de promover encapsulação com elevada eficiência (40-50%) é através do método desenvolvido por Kirby & Gregoriadis, 1984, formando vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs). Neste caso não há a necessidade do emprego de condições drásticas, além de ser bastante simples e possuir a capacidade de incorporar uma grande variedade de materiais, podendo, por exemplo, encapsular proteínas ou outros compostos sensíveis à temperatura (Gregoriadis, 1993). O conceito DRV baseia-se na indução da fusão de vesículas pré-formadas através da desidratação (no caso a liofilização) e rehidratação em condições controladas, formando lipossomas multilamelares. O composto bioativo a ser encapsulado pode ser incorporado (i) na primeira hidratação de formação inicial dos lipossomas, (ii) após a obtenção de lipossomas (SUV-vesículas unilamelares pequenas), através de sua mistura com uma solução contendo o bioativo em etapa anterior à desidratação, (iii) na rehidratação. Dependendo da sua composição, os lipossomas podem ser reconstituídos em MLVs (vesículas multilamelares) ou grandes agregados e em SUVs. Em geral adiciona-se um açúcar, com propriedades vítreas, tais como trealose (Crowe et al., 1985), manitol ou sacarose, para preservar as estruturas na desidratação e rehidratação.

Os métodos passíveis de escalonamento são compostos de duas etapas principais: formação de uma estrutura lipídica intermediária e posterior hidratação

desta estrutura. Os principais métodos escalonáveis são: atomização por “spray drying”, desidratação-rehidratação (DRV), microfluidização e injeção de etanol. No método da desidratação-rehidratação (DRV), o emprego da liofilização viabiliza a utilização desta técnica em escala industrial, uma vez que este equipamento de secagem já tem utilização bastante difundida industrialmente. A desvantagem é que lipossomas pré-formados também devem ser produzidos em escala industrial.

Diversas novas técnicas de produção de lipossomas em larga escala são apresentadas em patentes depositadas, principalmente, nos Estados Unidos, Europa e Japão (Adamich et al., 1986, Benameur et al., 2001, Bracken, 1990, Collins, 2002, Tournier et al., 1999). Dentre essas técnicas pode-se destacar a produção de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas, em forma de filmes e expandidas. Este método consiste de uma variação do método laboratorial de hidratação do filme seco de lipídios. Neste caso, o filme é formado na superfície interna de um conjunto de tubos dispostos paralelamente ou em colunas de leito fixo ou expandido (Tournier et al., 1999).

Para a configuração multitubular, o sistema para deposição de lipídios consiste de uma coluna preenchida com tubos dispostos paralelamente. O número de tubos e sua geometria devem ser determinados de forma a se obter uma relação máxima de área por volume. O sistema pode ser operado de diferentes maneiras como, por exemplo, com relação ao solvente que pode ser alimentado e disperso tanto na parte interna quanto na parte externa dos tubos, mas preferencialmente na parte interna para que seja propiciado melhor controle da temperatura através de circulação de água de aquecimento na parte externa.

A configuração em leito fixo é composta por uma coluna de vidro pyrex com 5 cm de altura e diâmetro interno de 0,5 cm contendo anéis de Raschig como recheio, porém operando em processo do tipo escoamento descendente, com distribuidor de fluxo no topo da coluna. A operação baseia-se na adição da solução em fase orgânica pelo topo da coluna até que se identifique excesso de solução no fundo da coluna. Este excesso é então drenado e a etapa de secagem é iniciada, com a introdução de nitrogênio aquecido durante 2 horas, seguido de

vácuo até completa remoção do solvente orgânico. A hidratação é então realizada através da recirculação da fase aquosa. Outra configuração de processo também testada por estes autores é a utilização da mesma coluna, porém em leito fluidizado. Mais uma vez a fase orgânica é adicionada ao leito e o excesso é removido, seguindo o mesmo processo de secagem e hidratação descrito para a configuração em leito fixo.

Os mesmos autores observaram que a formação dos lipossomas é mais eficiente e aproveita-se a máxima capacidade do equipamento utilizado quando o depósito lipídico obtido da evaporação do solvente é expandido em uma estrutura tridimensional. Nesse caso, a elevada razão entre a área de contato dos lipídios com a fase aquosa, ou seja, a área superficial da estrutura expandida e o volume de fase aquosa tornam a hidratação muito mais eficiente, podendo obter altas eficiências de encapsulação.

A evaporação do solvente pode ser realizada a temperaturas superiores à temperatura ambiente ou à pressão reduzida, ou mesmo combinando-se pressão reduzida e altas temperaturas. Tournier et al., 1999 observaram que a taxa de evaporação tem forte influência no grau de expansão da estrutura lipídica e, portanto, para uma expansão ótima é necessário um controle apropriado da quantidade de calor e da pressão dentro do sistema, sobretudo quando se está próximo do final da evaporação e a solução torna-se mais viscosa. Neste ponto, uma ligeira redução da pressão resultará em uma expansão relativamente rápida (formação de espuma). Podem ser obtidos diferentes graus de expansão da estrutura lipídica, através do balanço adequado de temperatura e pressão para um dado solvente ou mistura de solventes.

Nas situações anteriormente citadas, além da alta produtividade, outras vantagens muito desejadas pela indústria são obtidas como a possibilidade de aumento de escala, a facilidade de controle da etapa de hidratação, tempos de processamento reduzidos, uso de materiais de construção de baixo custo e utilização do mesmo sistema para deposição, evaporação do solvente e

hidratação da estrutura lipídica expandida. A técnica também permite a produção de lipossomas em condições estéreis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os materiais utilizados para produção dos lipossomas catiônicos ou agregados lipídicos contendo DNA foram:

- (i) Plasmídeo pVAX-hsp65 (6 kb), codificando o antígeno *M.leprae* hsp65 (uma *heat shock protein* de 65 Da), fornecido pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (FMRP-USP), coordenado pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva e co-orientador deste trabalho. Informações específicas sobre o vetor (pVAX1, Invitrogen) encontram-se disponíveis no Anexo II. O plasmídeo foi fornecido em água a uma concentração de 1,43 mg/mL.
- (ii) Fosfatidilcolina natural de ovo (EPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) adquiridos da Avanti Polar Lipids; Clorofórmio e etanol adquiridos da Sigma; água para injeção da Baker.
- (iii) Na eletroforese foram usados os materiais: agarose, com padrão para eletroforese adquirida da PROMEGA, brometo de etídio, ácido acético, azul de bromofenol, Ficoll 400 e xileno cianol adquiridos da SIGMA e enzima de restrição Not I e marcador de massa molar 1 kb Plus DNA ladder adquiridos da Invitrogen.
- (iv) Os ensaios de fluorescência foram feitos com a sonda PicoGreen adquirida da Molecular Probes.
- (v) O peptídeo com sequência de aminoácidos que possui característica de direcionador para núcleo celular (NLS – “Nuclear Localisation Signal”) foi sintetizado pelo Prof. Dr. Clóvis Ryuichi Nakae da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), na Escola Paulista de Medicina (Departamento de Biofísica). Este peptídeo, cuja seqüência de aminoácidos é apresentada na

Figura 11, foi liofilizado e ressuspendido em água padrão para injeção, pH 4,0, antes de sua utilização.

K C R G K V P G K Y G K G P K K K R K V C



Figura 11: Sequência de aminoácidos do peptídeo de característica de direcionamento nuclear (NLS). O terminal amino encontra-se no início da sequência com a lisina (K) e o terminal carboxílico com a cisteína (C).

(vi) Os solventes clorofórmio, metanol e etanol foram da marca SIGMA.

4.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos foram:

- (i) Evaporador rotatório (ART LAB),
- (ii) Extrusora de aço inox, com volume de 10 mL e camisa térmica para circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc.,
- (iii) Liofilizador , marca Liobrás, modelo L-101;
- (iv) Sistema capilar escalonável para a produção de lipossomas, composto de:
 - a. Tubo de vidro pyrex capilar de diâmetro interno 1,6 mm e altura 11,5 cm;
 - b. Válvula multiposição com 4 canais e 2 vias LV-4 da Amersham Pharmacia Biotech®;
 - c. Bomba peristáltica masterflex/Digi-Staltic, com cabeçote modelo 7013-20;

- d. Banho termostaticado de circulação Poly Science Série 8000;
- e. Bomba de vácuo Edwards;
- f. Mangueira Masterflex[®] 96410-13;
- g. Espectrofotômetro UV-visível, marca Hitachi, modelo U-2001;
- (v) Espectrofotômetro de espalhamento de luz por incidência de raios laser, marca Malvern Autosizer, modelo 4700;
- (vi) Sistema de água ultrapura, marca Milli-Q Millipore, catálogo No. QTUM000EX;
- (vii) Equipamento para calorimetria exploratória diferencial, DSC 2920 – TA Instruments;
- (viii) Equipamento para medida de potencial zeta, marca Malvern Autosizer, modelo 3000;
- (ix) Fluorímetro de placa, marca Molecular Device, modelo Gemini XS;
- (x) Microscópio Carl Zeiss, CEM 902, equipado com filtro de energia Castaing-Henry-Ottensmeyer;
- (xi) Microscópio eletrônico de varredura, marca LEICA, modelo LEO 440i equipado com detector secundário de elétrons;
- (xii) Espectrômetro de massas Quattro Micro API[®], marca Micromass, Manchester, U.K;

4.3. Formulações lipídicas

As formulações lipídicas contêm basicamente DNA plasmideal (pDNA - que contém o segmento de DNA que codifica a proteína hsp65) e os componentes lipídicos (estrutural, catiônico e “helper” para as estruturas lipossomais e somente catiônico e “helper” para os lipoplexos).

O pDNA destinado à aplicação como vacina gênica para a tuberculose é formado por (i) pVAX1, vetor comercial, utilizado para atender os requisitos necessários do órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) para vacina de DNA humana, pois contém o gene de resistência à canamicina (vide Anexo II) (ii) inserto de DNA que codifica a proteína hsp65. Para a obtenção do plasmídeo final destinado à vacina, realizou-se uma subclonagem da sequência de 3000 pb da hsp65 no sítio BamHI - NotI do pVAX1 gerando o pVAX-hsp65 com 6000 pb no total.

A formulação lipídica utilizada para produção de lipossomas catiônicos do tipo DRV foi estabelecida de acordo com estudos de Perrie et al., 2001, que sugere que a concentração de lipídio catiônico (DOTAP) deva estar entre 4 e 8 μmol , 16 μmol de PC e 8 μmol de DOPE, em 2 mL de solução lipossomal, para uma razão de cargas ($R_{+/-}$ 20). Nestas condições, a formulação utilizada por este autor gera uma concentração de 5 μg de pDNA para cada 100 μL de solução lipossomal. Nestes estudos, o autor realizou uma seqüência de 3 imunizações com dosagem de 10 μg de pDNA/vacina lipídica.

Para atingir o requisito de dosagem definido pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose da USP de Ribeirão Preto, que visa o desenvolvimento de uma vacina de dose única, a dosagem de pDNA teve que ser ajustada para atingir a concentração de 50 μg de DNA em 100 μL de preparação lipídica. Neste contexto, a formulação proposta inicialmente por Perrie et al., 2001 foi adaptada e as concentrações lipídica e de DNA aumentaram, gerando uma razão de cargas ($R_{+/-}$) 10, conforme apresentado na Tabela 3 para as estruturas lipossomais do tipo DRV(DNA) e DRV-DNA.

Vale ressaltar que, apesar do aumento das concentrações lipídicas, as proporções de cada componente lipídico foram mantidas nas faixas ótimas já estabelecidas por Perrie et al., 2001. Além disso, o meio de dispersão utilizado foi NaCl 0,9% (salina, concentração fisiológica ou 150 mM), viabilizando a aplicação *in vivo*.

A partir da definição da concentração lipídica para as estruturas lipossomais [DRV-DNA e DRV(DNA)], a formulação estabelecida para os lipoplexos foram basicamente similares, exceto pela ausência do lipídio EPC, conforme também descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Formulações lipídicas utilizadas para lipossomas catiônicos do tipo DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexo, para uma razão de cargas ($R_{+/-}$, lipídio catiônico/DNA) 10.

Componente lipídico	Estrutura lipídica			
	DRV(DNA) e DRV-DNA (i)		Lipoplexo (ii)	
	Porcentagem Molar (%)	Concentração Molar (mM)	Porcentagem Molar (%)	Concentração Molar (mM)
Estrutural (PC)	50	128	---	---
“Helper” (DOPE)	25	64	50	64
Catiônico (DOTAP)	25	64	50	64
Total	100	256	100	128

(i) DRV sem o DNA associado (“DRV vazio”) possui formulação lipídica idêntica às estruturas DRV-DNA e DRV(DNA);

(ii) Estrutura lipídica sem a associação do DNA (agregados lipídicos) possuem formulação idêntica aos lipoplexos, exceto pela ausência de DNA.

A fim de aumentar a eficiência profilática da vacina lipossomal, a segunda etapa deste projeto de pesquisa contemplou a inclusão de um peptídeo sintético que possui uma seqüência de aminoácidos que permite a ativação de um transporte ativo do DNA com direcionamento nuclear. A formulação empregada

neste caso é apresentada na Tabela 4 para a obtenção de 1000 µL desta vacina em solução fisiológica (NaCl 0,9%):

Tabela 4: Formulação utilizada para a obtenção de 1 mL de vacina lipossomal contendo DNA e peptídeo com sinal direcionador.

Composição	Massa (µg)	Solução	
		Concentração(µg/µL)	Volume (µL)
DNA (i)	534,82	2,86	187
Peptídeo (NLS) (i)	501,16	2,68	187
Lipossoma (DOTAP/DOPE/EPC, 25/25/50% molar) (em NaCl 1,44%) (i)	47400	75,72	626

(i) *Soluções de DNA e peptídeo foram preparadas em água (para injeção)*

(ii) *Solução lipossomal preparada em solução salina , com concentração 1,44% de NaCl para garantir uma concentração salina no final da preparação na condição fisiológica (0,9% de NaCl).*

4.4. Preparações lipídicas

4.4.1. Preparação das estruturas lipídicas para testes *in vitro*, *in vivo* e caracterizações físico-químicas

Todas as estruturas lipídicas destinadas a testes *in vivo* e *in vitro* devem cumprir requisitos de esterilidade microbiológica e ausência de pirogênios (ou endotoxinas).

A administração parenteral de pirogênio influencia a regulação do hipotálamo, causando febre, choque e até mesmo pode conduzir à morte se administrado em concentrações elevadas. Endotoxinas são contaminantes perigosos da classe dos lipossacarídeos (LPS), originadas das paredes celulares de células Gram-positivas e possuem efeito pirogênico (Walsh & Headon, 1974).

O parâmetro estéril foi garantido através da manipulação e produção das estruturas em capela de fluxo laminar e com a utilização de material esterilizado. A despirogenização das vidrarias foi efetuada através do aquecimento, mantendo a temperatura a 180°C durante 12 horas, seguindo protocolo já praticado pelo grupo de pesquisa de Ribeirão Preto (Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto). A solução salina e água utilizadas na obtenção das estruturas foram compradas em padrão de injeção, garantindo a esterilidade e ausência de pirogênio.

As metodologias descritas foram utilizadas para a preparação das estruturas vazias, seguidas da associação com o DNA e estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5: Sumário das estruturas lipídicas vazias e associadas ao DNA, identificando as respectivas nomenclaturas, designação, posicionamento relativo do DNA, método de preparação e item da metodologia.

Nomenclatura	Designação	Posicionamento do DNA	Método de preparação dos lipossomas	Item
ESTRUTURAS VAZIAS				
LEs	Lipossomas extrudados	---	Bangham	4.4.1.1
DRVs	Lipossomas DRVs vazios	---	Desidratação-rehidratação	4.4.1.2
Agregados lipídicos	Agregados lipídicos	---	Hidratação do filme seco lipídico	4.4.1.3
ESTRUTURAS ASSOCIADAS AO DNA				
LEs-DNA	Complexos lipossoma catiônico extrudado-DNA	Externo à superfície	Incubação de LEs e DNA	4.4.1.4
DRV(DNA)	Lipossomas DRVs com DNA encapsulado	Encapsulado	Desidratação-rehidratação	4.4.1.5
DRV-DNA	Lipossomas DRVs complexados com DNA	Externo à superfície	Incubação de DRVs e DNA	4.4.1.6
Lipoplexos	Lipoplexos	Externo à superfície	Incubação de agregados lipídicos e DNA	4.4.1.7
ESTRUTURAS CONTENDO PEPTÍDEO SINTÉTICO E DNA				
Complexo “ternário” (lipossoma/ DNA/peptídeo)	Lipossomas DRVs complexados com DNA/peptídeo	DNA complexado com peptídeo	Desidratação-rehidratação	4.4.1.8

4.4.1.1. Lipossomas Extrudados: LEs

Os lipossomas extrudados foram preparados pelo método de Bangham (Bangham et al., 1965, New, 1990). Soluções estoque para cada um dos lipídios foram preparadas em clorofórmio e armazenadas a -20°C . Basicamente, as soluções lipídicas são adicionadas na proporção adequada (Tabela 4, item 4.3) em balão de fundo redondo e homogeneizadas durante 5 minutos em evaporador rotatório (ART LAB), sendo em seguida promovida a evaporação do solvente sob vácuo relativo de 650 mmHg, à temperatura superior à maior temperatura de transição de fase dos componentes até a formação do filme seco. A seguir, o filme foi hidratado com água de padrão para injeção. Estas estruturas lipossomais foram, posteriormente, extrudadas 15 vezes em extrusora de aço inox, com volume de 10 mL e camisa térmica para a circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., sob pressão aproximada de 15 Kgf/cm^2 , utilizando membrana de policarbonato com diâmetro nominal de poros de 100 nm.

4.4.1.2. Lipossomas obtidos pelo método da desidratação-rehidratação: DRVs

Os lipossomas DRVs, foram preparados através do método da desidratação-rehidratação (Kirby & Gregoriadis, 1984). O método consiste em três etapas: (i) preparação prévia de lipossomas catiônicos extrudados, descrito no item 4.4.1.1; (ii) desidratação através de liofilização (com congelamento das amostras em nitrogênio líquido e liofilização durante 24 horas); (iii) rehidratação das partículas liofilizadas em temperatura superior à de transição de fases dos lipídios. Neste caso utilizou-se temperatura de 4°C e agitação em vórtice.

4.4.1.3. Agregados lipídicos catiônicos

Os agregados lipídicos foram preparados pela hidratação do filme lipídico seco, seguido de hidratação com solução salina 0,9% ou 1,44, conforme descrito a seguir.

No método do filme seco lipídico, as soluções lipídicas (DOPE e DOTAP) preparadas em clorofórmio são adicionadas na proporção adequada (formulação descrita na Tabela 4, item 4.3) em balão de fundo redondo e homogeneizadas durante 5 minutos em evaporador rotatório, sendo em seguida promovida a evaporação do solvente sob vácuo relativo de 650 mmHg, à temperatura superior à maior temperatura de transição de fase dos componentes até a formação do filme seco. A seguir, o filme foi hidratado com solução salina 0,9% (estruturas sem DNA) ou 1,44% (para complexação com o DNA, fornecido em água), em temperatura de 4°C.

4.4.1.4. DNA associado à superfície externa de lipossomas extrudados: LEs-DNA

A associação/complexação do DNA na superfície externa de lipossomas extrudados foi realizada incubando o DNA com lipossomas extrudados (item 4.4.1.1.) em temperatura baixa (entre 0 e 12 °C, de acordo com Wasan et al., 1999), em banho de gelo. Estas estruturas foram denominadas LEs-DNA.

4.4.1.5. DNA incorporado em lipossomas DRVs: DRV(DNA)

A incorporação de DNA nos lipossomas DRVs foi realizada por desidratação/re-hidratação, conforme descrito no item 4.4.1.2. Porém, neste caso, insere-se a etapa de obtenção de partículas LEs-DNA (descrito no item 4.4.1.4) antes de se realizar a desidratação.

4.4.1.6. DNA associado à superfície externa dos lipossomas DRVs: DRV-DNA

A associação/complexação do DNA na superfície externa dos lipossomas DRVs foi realizada através da incubação em temperatura baixa (entre 0 e 12 °C), obtida através de banho de gelo. Basicamente, a solução de plasmídeo é adicionada em solução de DRVs obtidos conforme descrito no item 4.4.1.2 e

agitada com vórtice durante 40 segundos. As estruturas coloidais geradas foram denominadas DRV-DNA.

4.4.1.7. Lipoplexos

Os lipoplexos foram preparados através de complexação entre agregados lipídicos (descrito no item 4.4.1.3) e DNA na razão de cargas ($R_{+/-}$) apropriada. A complexação é realizada através da adição da solução contendo o plasmídeo na solução lipídica, em temperatura baixa (entre 0 e 12°C), controlada através de banho de gelo e agitação com vórtice durante 40 segundos..

4.4.1.8. Preparação do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo

A formação da estrutura coloidal ternária contendo lipossomas DRV , DNA e peptídeo de característica de direcionador nuclear (NLS) foi realizada em duas etapas. Inicialmente, o peptídeo foi adicionado ao DNA, formando um complexo binário, sendo esse adicionado ao DRV, formando o complexo ternário.

- Complexação DNA-peptídeo:

A formação do complexo binário DNA-peptídeo foi realizada através da adição da quantidade apropriada de peptídeo ao DNA, sob agitação na forma de vórtice durante 40 segundos e incubada entre 0 e 4 °C durante 10 minutos (banho de gelo).

- Formação do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo:

O complexo DNA-peptídeo foi adicionado à solução lipossomal DRV, sob agitação do tipo vórtice durante 40 segundos e incubado à temperatura entre 0 e 4 °C durante 10 minutos. Em seguida a mistura coloidal foi agitada durante 10 segundos em vórtice e mantida à temperatura ambiente (25°C) por, no mínimo, 30 minutos.

4.4.2. Lipossomas produzidos em sistema tubular

A metodologia para produção de lipossomas em sistema tubular foi realizada através da adsorção de lipídios previamente dispersos em 3 mL de etanol em instalação contendo capilar. Inicialmente, as tubulações secundárias foram saturadas com solução alcoólica dos lipídios (nas mesmas proporções molares). A alimentação da coluna foi realizada pelo fundo e parâmetros como tempo, vazão e temperatura de recirculação foram estabelecidos conforme descrito a seguir:

- Tempo de recirculação da dispersão alcoólica na coluna: 40 minutos;
- Temperatura de recirculação para adsorção dos lipídios: 35°C ;
- Vazão de recirculação: 8 mL/min.

Após a adsorção, a coluna foi drenada para a remoção do excesso de solução lipídica e subsequente secagem para a formação do filme lipídico nas paredes do capilar de vidro. As condições de secagem foram:

- Temperatura da coluna: 45°C (mantida por jaqueta de aquecimento);
- Vácuo relativo: 650 mmHg;
- Tempo de secagem: 1 hora.

Após a secagem, foi feita a hidratação através da recirculação de 3 mL da fase aquosa (água), controlando os seguintes parâmetros:

- Vazão de recirculação da fase aquosa: 8 mL/min;
- Tempo de rehidratação: 40 minutos;
- Temperatura de rehidratação: ambiente (25°C).

A formulação lipídica utilizada neste estudo contém os três lipídios já estabelecido para as aplicações *in vivo* e nas mesmas proporções molares (EPC, DOPE e DOTAP 50/25/25% molar), para todas as concentrações de lipídios totais estudada.

4.5. Caracterizações físico-químicas

As estruturas lipídicas destinadas à aplicação *in vivo* foram caracterizadas quanto à integridade do plasmídeo, avaliação da razão de cargas na qual todo o plasmídeo encontra-se associado à estrutura lipídica, diâmetro médio e distribuição de tamanhos, transição de fases, carga superficial, acessibilidade do DNA, microscopia eletrônica de transmissão e estabilidade física ao longo da estocagem pelos métodos descritos abaixo. A inclusão do peptídeo com sequência que ativa transporte para direcionamento nuclear na estrutura lipídica do tipo DRV-DNA também utilizou técnicas semelhantes às descritas acima, incluindo microscopia óptica para a determinação do diâmetro médio do complexo binário DNA/Peptídeo.

O estudo de escalonamento da produção de lipossomas também utilizou técnicas de caracterização do tipo diâmetro médio e distribuição de tamanhos, microscopia eletrônica de varredura (MEV), carga superficial (potencial zeta), espectrometria de massas.

4.5.1. Integridade do plasmídeo

A influência da desidratação-rehidratação e complexação eletrostática na integridade do plasmídeo nu e veiculado em estruturas DRV e lipoplexo foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose. Para que esta técnica possa ser empregada, o DNA vetorizado em estruturas lipídicas deve ser separado, purificado e clivado com enzima de restrição conforme descrição abaixo:

4.5.1.1. Separação e purificação de DNA encapsulado/complexado com estruturas lipídicas

O DNA encapsulado/complexado em lipossomas DRVs e lipoplexos foi separado das estruturas lipídicas através da adição de uma mistura de solventes orgânicos (clorofórmio:metanol 9:1v/v) em 1,5 vezes o volume da solução lipídica. As amostras foram intensamente agitadas e centrifugadas a 5000 x g durante 5 minutos e temperatura ambiente (25°C), para permitir que as fases orgânica e aquosa separem-se totalmente. A fase inferior (orgânica) contém os lipídios extraídos e a fase superior (aquosa) contém o DNA, insolúvel na fase orgânica. A fase aquosa, contendo o DNA foi, então, removida e submetida à precipitação e purificação com etanol: Para 50 µL de amostra, adicionou-se 100 µL de etanol absoluto. As amostras foram, então, acondicionadas em freezer (-20°C) durante 1 hora, sendo, então, centrifugadas a 21000 x g sob refrigeração (4 °C), durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 21000 x g sob refrigeração (4 °C), durante 10 minutos, sendo em seguida retirado o sobrenadante e secas em vácuo durante 15 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 15 µL água Milli-Q e hidratado sob agitação em thermomixer compact a 37°C, 600 rpm durante 10 minutos.

A seguir, o plasmídeo nu (utilizado como padrão) e o separado das estruturas lipídicas e purificado sofreram digestão com enzima de restrição específica, conforme descrito a seguir.

4.5.1.2. Digestão do plasmídeo pVAXhsp65 com enzimas de restrição Bam HI

As amostras de DNA foram submetidas à digestão com a enzima de restrição Bam HI (7 U/µL plasmídeo) durante 12 horas a 37°C, em volume reacional de 10 µL. Esta enzima foi responsável pela linearização do plasmídeo.

Após a digestão do plasmídeo, adicionou-se 2 μ L de solução de azul de bromofenol (15% v/v Ficoll 400, 0,1 % v/v xileno cianol, 0,1% p/v azul de bromofenol), para visualização no gel durante a corrida eletroforética. Preparou-se, também, uma amostra como padrão de massa molar 1 kb plus DNA ladder, através da adição de 2 μ L deste marcador, 2 μ L de solução de azul de bromofenol em volume aquoso total de 10 μ L. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese conforme descrito a seguir.

4.5.1.3. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose 0,8% usado na eletroforese foi preparado em solução tampão TAE 1 X (40 mM TRIS-Acetato, 1 mM EDTA). Para cada 100 mL de solução de gel de agarose, adiciona-se 5 μ L de solução de brometo de etídio (EtBr - concentração 5mg/mL). Este reagente é um intercalador em DNA, que possibilita visualização das bandas de EtBr-DNA quando o gel é submetido à luz ultravioleta. O gel foi acondicionado em cubas de eletroforese e imerso em solução tampão TAE 1X. As amostras preparadas são adicionadas em poços e a corrida eletroforética é realizada sob tensão de 70 V, durante aproximadamente 40 minutos, sendo então, fotografado sob de luz ultravioleta, gerando as imagens.

4.5.2. Incorporação do DNA nas estruturas

A incorporação do DNA nas estruturas lipídicas e no complexo binário DNA/peptídeo foi verificada com a técnica de eletroforese em gel de agarose conforme descrito abaixo. Em cada caso, uma quantidade fixa de DNA foi complexada à diferentes quantidades de estruturas lipídicas (LE, DRV ou agregado lipídico) ou peptídeo com sinal de direcionamento nuclear e submetidos à corrida eletroforética.

4.5.2.1. Determinação da razão molar para completa incorporação do DNA nas estruturas lipídicas (sistemas contendo lipídios e DNA)

As complexações envolvendo DNA e um tipo de estrutura lipídica (LE, DRV ou agregado lipídico) foram realizadas nas seguintes condições: Dois microgramas de DNA foram complexados à quantidade de lipídio catiônico (contido na estrutura lipídica) em várias razões de carga, em volume reacional de 40 μL , tendo solução salina (0,9% NaCl) como diluente. Após 10 minutos de incubação, adiciona-se 6 μL de solução de azul de bromofenol e realiza-se a corrida eletroforética conforme descrito no item 4.5.1.3.

4.5.2.2. Determinação da proporção molar para completa incorporação do DNA nas estruturas DNA-peptídeo

Através de eletroforese em gel de agarose é possível identificar a razão de molar entre as cargas positivas do peptídeo e grupos fosfato (PO_4^-) do DNA, que promove a complexação completa do DNA com o peptídeo. A forma de obtenção da razão molar cargas positivas do peptídeo/ PO_4^{3-} é apresentada no Anexo VII.

Complexos contendo o peptídeo e DNA (2 μg /amostra) em várias razões molares foram obtidos em volume reacional de 40 μL , tendo solução salina (0,9% NaCl) como diluente. Após 10 minutos de incubação, adicionou-se 6 μL de solução de azul de bromofenol e realizou-se a corrida eletroforética conforme descrito no item 4.5.1.3.

4.5.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos para estruturas lipídicas

O diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das estruturas coloidais foram determinados por espalhamento da luz, através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) utilizando laser de alta potência, em equipamento Malvern Autosizer 4700.

Esta técnica baseia-se na dependência das flutuações de intensidade do espalhamento de luz em função do tempo, devido ao movimento Browniano das partículas em suspensão. Partículas menores difundem mais rápido que as maiores e a taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão (New, 1990). O coeficiente de difusão médio translacional dos lipossomas em solução diluída pode ser medido e o raio hidrodinâmico médio, R_h , é calculado pela equação de Stokes-Einstein (Lasic et al, 1993), conforme a Equação 2.

$$R_h = (kT)/(6D\mu) \quad \text{Equação 2}$$

onde,

k: constante de Boltzmann,

T: temperatura absoluta,

D: coeficiente de difusão das partículas,

μ : viscosidade do solvente.

As medidas foram realizadas em ângulo de 90° em relação ao feixe de raio laser (He-Ne) incidente e os diâmetros foram analisados a partir dos valores das intensidades de espalhamento de luz.

4.5.3.1. Diâmetro médio da dispersão coloidal

A partir da determinação do diâmetro hidrodinâmico e da distribuição de tamanhos, pode-se estimar o diâmetro médio da dispersão coloidal, através da média ponderada entre os diâmetros hidrodinâmicos e as respectivas porcentagens populacionais referentes às intensidades de luz espalhada.

4.5.3.2. Área superficial por unidade de massa: As/M

Uma vez calculado o diâmetro médio populacional, pode-se calcular a área superficial das estruturas por unidade de massa (As/M), considerando que as

partículas coloidais possuem geometria esférica e distribuição unimodal, de acordo com a Equação 3.

$$As/M = \frac{\pi \cdot (\bar{d})^2}{m} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

As/M: área superficial das estruturas por unidade de massa (nm²/mg);

\bar{d} : diâmetro médio das partículas da dispersão coloidal (nm);

m : massa total da formulação (mg).

4.5.4. Estabilidade física de estocagem

A avaliação da estabilidade das estruturas lipídicas destinadas à aplicação *in vivo* foi realizada a partir de medidas do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos conforme descrito no item 4.5.3. As preparações foram estocadas sob refrigeração entre 8 e 12°C., em condições estéreis.

4.5.5. Determinação do diâmetro médio dos complexos DNA-NLS

Os complexos DNA-NLS foram observados através de microscópio óptico LEICA, modelo DMLM, com aquisição de imagem para a determinação da distribuição de tamanho, através do software Leica Qwin500. A partir dos diâmetros da população observada, construiu-se um histograma da distribuição de tamanhos, determinação do diâmetro médio e respectivo desvio padrão.

4.5.6. Transição de fases

A temperatura de transição de fases e a variação de entalpia (ΔH) das estruturas lipídicas vazias e contendo o DNA a R_{+/-} 10 foram determinadas através

de calorimetria exploratória diferencial (DSC 2920 – TA Instruments). Dez miligramas de cada formulação foram liofilizados e submetidos à análise com rampa de aquecimento de 10°C/minuto, entre –40 e +60°C, utilizando nitrogênio gasoso de qualidade cromatográfica e ar como referência.

O histórico térmico foi investigado para as estruturas vazias, também com rampa de aquecimento de 10°C/minuto.

Uma vez conhecida a temperatura de transição de fases e a variação de entalpia, a variação de entropia (ΔS) foi calculada através da Equação 4 (Huang et al., 1999).

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad \text{Equação 4}$$

onde,

T_m : temperatura de transição de fases gel para líquido cristalino (K)

ΔH : Variação de entalpia (cal/mol)

ΔS : Variação de entropia (cal/(mol.K))

4.5.7. Carga superficial

A densidade de carga superficial das diferentes estruturas lipídicas utilizadas para os teste *in vitro* e *in vivo* e caracterização dos lipossomas produzidos em unidade escalonável foi avaliada a partir de medidas do potencial zeta (ζ). As medidas foram realizadas utilizando solução salina (NaCl 0,9%) ou água, a 25°C como meio de dispersão, em equipamento Malvern Autosizer modelo 3000.

4.5.8. Acessibilidade de sonda de fluorescência ao DNA incorporado na estrutura lipídica ou no complexo binário DNA/peptídeo

A acessibilidade da sonda de DNA nas várias estruturas (DRVs, lipoplexos, DNA-peptídeo e DRV-DNA-peptídeo) foi determinada a partir da fluorescência, com emprego da sonda comercial PicoGreen, que possui propriedade de fluorescência ultra-sensível quando conjugado com DNA dupla fita (dsDNA) em solução.

- Solução de Trabalho:

Uma solução de trabalho contendo a sonda de fluorescência foi preparada através da diluição da solução de estoque (original, fornecida pelo fabricante) do PicoGreen em tampão TE (10mM Tris/HCl/1mM EDTA, pH 7,5) em 200 vezes.

- Solução de complexação:

A solução de complexação foi preparada de acordo com o tipo de estrutura avaliada, podendo ser dividida em três grandes categorias: (i) DRVs e agregados lipídicos; (ii) DNA complexado ao peptídeo com sinal de direcionamento nuclear e (iii) sistema ternário, composto por DRV-DNA-peptídeo:

- Complexos formados por DRVs ou agregados lipídicos e DNA:

Cinquenta microlitros de uma solução contendo 1 µg/mL de DNA (pVAX-hsp65) foi complexada com 50 µL de solução lipídica (DRVs ou agregados lipídicos), na razão entre cargas ($R_{+/-}$) apropriada e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente (25-27°C).

- Complexos formados por DNA e peptídeo:

Para o complexo DNA-peptídeo, 50 µL de uma solução contendo 1 µg/ml de DNA (pVAX-hsp65) foi complexada com 50 µl de solução contendo o peptídeo, na razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} apropriada e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente (25-27°C).

- Complexo ternário DRV- DNA- peptídeo:

Para os ensaios envolvendo o complexo ternário DRV-DNA-peptídeo, o procedimento é basicamente o mesmo, porém diferenciando-se na preparação dos complexos: trinta e três microlitros de uma solução contendo 1 µg/mL de DNA (pVAX-hsp65) foi complexada com 33µL de solução contendo o peptídeo, na razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} apropriada, incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente (25-27°C). Este complexo binário foi adicionado a 33 µL de solução de DRV vazio, na razão de cargas $R_{+/-}$ 10 (utilizada nas formulações para testes *in vivo*).

- *Medida da intensidade de fluorescência*

Cem microlitros da solução de trabalho foi adicionada à solução de complexação e após 2 a 4 minutos de incubação, realizou-se a medida da fluorescência em fluorímetro de placa (Gemini XS, Molecular Device). As medidas de fluorescência foram realizadas com excitação e emissão em 485 e 525 nm, respectivamente, conforme orientação do fabricante.

Os perfis de decaimento de fluorescência foram expressos em valores percentuais, em relação à intensidade de fluorescência emitida pelo DNA livre.

4.5.9. Morfologia das estruturas lipídicas

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para visualizar e analisar as morfologias das diferentes estruturas lipídicas. Utilizou-se telas de cobre de 200 mesh como suporte para a amostra recoberta com carbono com filme de colódio (parloidin com acetato de celulose). Cada preparação lipídica foi diluída para 1 mM (concentração lipídica) e, então, aplicada uma gota sobre a tela e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente retirado o excesso de solução lipídica. Uma gota de acetato de uranila 1% p/v (em solução salina 0,9%) foi, então, adicionada mantendo-se a incubação durante 1 minuto à temperatura ambiente, sendo também o excesso eliminado e a tela seca ao ar. As estruturas foram visualizadas em microscópio Carl Zeiss, CEM 902,

equipado com filtro de energia Castaing-Henry-Ottensmeyer, sendo as imagens adquiridas através de câmera CCD (Proscan).

É válido ressaltar que a diluição das preparações lipídicas em mesmo tampão ao qual estão dispersas não altera o diâmetro hidrodinâmico das estruturas coloidais (avaliação efetuada a partir de espectroscopia de correlação de fótons - PCS).

4.5.10. Cinética da formação dos lipossomas em sistema capilar

A cinética de formação dos lipossomas na unidade escalonável foi construída a partir de medidas de absorvância a 340 nm (Espectrofotômetro UV-visível, marca Hitachi, modelo U-2001) de amostras em vários tempos (0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30 e 40 minutos) durante a hidratação do filme lipídico seco, descrita no item 4.4.2. A construção da curva de Absorvância versus tempo permite a análise da evolução da formação dos lipossomas.

4.5.11. Determinação da espessura do filme lipídico seco formado em tubo capilar

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi empregada a fim de determinar a espessura do filme lipídico seco obtido no capilar em etapa anterior à hidratação e consequente formação dos lipossomas na unidade escalonável de produção de lipossomas. Para isso, lipossomas foram produzidos na unidade capilar até a etapa de secagem, utilizando a concentração molar total de lipídios 50 mM na fase alcoólica. Em seguida a unidade capilar foi desmontada, cortada em várias alturas e submetida à microscopia eletrônica de varredura para identificação e medida da espessura do filme lipídico seco.

Todas as micrografias foram obtidas usando o microscópio LEICA, modelo LEO 440i equipado com detector secundário de elétrons. A voltagem de aceleração usada variou de 3 a 5kV. Inicialmente, as amostras foram fixadas em

um porta-amostra através de fita adesiva dupla-face. Posteriormente, essas amostras foram recobertas com ouro e analisadas.

As imagens foram analisadas em software Leica Qwin500 que permitiu a medida da espessura do filme seco em várias alturas do tubo capilar. A partir das medidas foi possível definir a média e o desvio padrão da espessura do filme lipídico seco.

4.5.12. Identificação qualitativa da presença dos lipídios funcionais nos lipossomas produzidos em tubo capilar

A técnica de espectrometria de massa foi empregada com o intuito de identificar a presença dos lipídios utilizados na unidade escalonável de produção de lipossomas em tubo capilar. Os espectros de massa por ionização em eletrospray, ESI-MS, foram obtidos em modo positivo utilizando espectrômetro de massas Quattro Micro API[®] (Micromass, Manchester, U.K.). As condições empregadas foram: temperaturas da fonte e dessolvatação em 120 e 300°C, respectivamente; voltagem do capilar e cone em 5.0 kV e 20 V, respectivamente. Cada amostra foi acondicionada a 35°C, para permitir completa solubilização dos lipídios (especialmente o DOPE), homogeneizada e uma alíquota de 25 µL foi retirada e transferida para tubos do tipo eppendorf contendo uma solução de água e acetonitrila (1:1; v/v) e ácido fórmico (concentração final de 0,1% v/v) para um volume final de 250 µL. As soluções foram injetadas em uma vazão de 5 µL/min, através de bomba de seringa (Harvard) e os espectros foram adquiridos na faixa de 600 a 800 *m/z*.

4.6. Modelagem da Cinética de Formação dos Lipossomas

Para simular a cinética de formação dos lipossomas na unidade escalonável de tubo capilar foi construído um modelo matemático desenvolvido

por Carneiro, 2004, baseado no trabalho inicial de Mortha et al., 1993, que descreve a dissolução de comprimidos em solução aquosa.

De acordo com o modelo proposto por Mortha et al., 1993, a dissolução do comprimido é um processo que depende tanto da penetração de água no comprimido, que é considerado um sólido poroso, quanto da reação de dissolução das espécies constituintes.

A penetração da água nos poros do comprimido é influenciada pela força de capilaridade entre o líquido e a superfície dos poros, que direciona o líquido para dentro dos poros e a força de arraste viscosa, exercida pelas paredes dos poros, que se opõe à penetração do líquido nos poros.

Considerando que a penetração do líquido nos poros segue a Equação 5 de Washburn (Washburn, 1921) aplicada a um sólido poroso pode-se escrever que:

$$L = \sqrt{\frac{\sigma \cdot \cos \theta \cdot d_H}{4 \cdot \tau^2 \cdot \eta}} \cdot \sqrt{t}$$

Equação 5

onde,

L : comprimento de penetração do líquido no capilar do sólido poroso no tempo t

σ : tensão superficial do líquido

θ : ângulo de contato do líquido com o sólido

d_H : diâmetro hidráulico dos poros do sólido

τ : tortuosidade do sólido

η : viscosidade do líquido

t : tempo

Em muitos casos, porém, essa equação não é válida para todas as fases da penetração do líquido no sólido, devido à existência de condições de estado não estacionário no fluxo de líquido. Sugere-se, nesses casos, a utilização de uma cinética de penetração que utilize a constante de penetração K, que pode ser escrita conforme a Equação 6 (Mortha et al., 1993).

$$L = K.t^{m(t)}$$

Equação 6

onde,

m(t) varia de 1, no início da penetração, até 0, no fim da penetração

K: constante de penetração

Como ocorrem modificações no comprimido e na solução aquosa pela dissolução das espécies, o valor de K também não é constante com tempo. Pode-se dessa forma escrever a Equação 6 de outra forma mais adequada para os cálculos, conforme Equação 7 (Mortha et al., 1993).

$$L = K(t).t^m$$

Equação 7

A diferenciação da Equação 7 leva à equação modificada da velocidade de penetração, conforme Equação 8.

$$\frac{dL}{dt} = \frac{L}{K} \cdot \frac{dK}{dt} + m.K^{\frac{1}{m}}.L^{\frac{m-1}{m}}$$

Equação 8

A integração da Equação 8 leva à Equação 5 no caso de $m = 0,5$ e

$$K = K_0 = \left(\frac{\sigma \cdot \cos \theta \cdot d_H}{4 \cdot \tau^2 \cdot \eta} \right)^{0,5}$$

A desintegração do comprimido resulta da reação dos constituintes, dentro dos poros, quando entram em contato com o líquido, e é limitada tanto pela taxa de reação dos constituintes quanto pela transferência de massa interna e externa.

Entende-se que a transferência de massa é um fenômeno que ocorre basicamente quando há variações de concentrações locais (Doran, 1997). A transferência de massa externa ocorre quando há transporte de soluto entre o meio externo (ou *bulk*) e a superfície do sólido. Já a transferência de massa interna se dá no interior do sólido, onde existem poros que permitem a difusão do soluto em seu interior.

- Transferência de massa externa dos compostos

A transferência de massa externa resulta da diferença de concentração das espécies em uma camada de líquido próxima a superfície do sólido, C_s , e a concentração no meio líquido externo, C_{ext} . O fenômeno pode ser representado pela Equação 9.

$$\frac{dm}{dt} = k_d \cdot S_{ext} \cdot (C_s - C_{ext}) \quad \text{Equação 9}$$

onde,

k_d : coeficiente de transferência de massa

C_s : concentração de fosfolípidios próxima à superfície do sólido

C_{ext} : concentração de fosfolípidios no meio líquido externo

S_{ext} : área externa do sólido do comprimido que pode ser calculada pela Equação 10.

$$S_{ext} = S_0 \left(1 - \frac{\varepsilon}{\tau} \right)$$

Equação 10

onde,

ε : porosidade do sólido

S_0 : área da superfície externa total do sólido

O coeficiente de transferência de massa k_d pode ser calculado através de correlações envolvendo os grupamentos adimensionais como Sherwood (Equações 11e 14), que é a razão entre as resistências ao transporte de massa molecular convectivo e difusivo; Reynolds (Equação 12) que caracteriza o regime de escoamento e Schimidt (Equação 13), definido como a razão entre as difusividades de momento e massa.

$$Sh = \alpha . Re^\beta . Sc^\gamma$$

Equação 11

$$Re = \frac{\rho . v . l}{\eta}$$

Equação 12

$$Sc = \frac{\eta}{\rho . D}$$

Equação 13

$$Sh = \frac{k_d \cdot l}{D}$$

Equação 14

onde,

ρ : densidade do líquido

η : viscosidade do líquido

D: difusividade das espécies no líquido

v: velocidade do líquido

l: comprimento característico da transferência de massa

- Transferência de massa interna dos compostos

A massa dissolvida é proporcional à superfície interna molhada e é uma função complexa da difusividade interna, da taxa de reação e da solubilidade das espécies no meio líquido. O fenômeno pode ser representado pela Equação 15 em que K_{int} é uma taxa constante proporcional à desintegração do sólido e S_{int} é a área dos poros penetrada pelo líquido, que para um sólido poroso pode ser expressa pela Equação 16.

$$\frac{dm}{dt} = K_{int} \cdot S_{int}(t)$$

Equação 15

onde

K_{int} : constante de transferência de massa interna

$$S_{\text{int}}(t) = 4 \cdot \frac{S_0 \cdot \varepsilon}{d_H} \cdot L(t)$$

Equação 16

O valor de K_{int} é de difícil predição e pode-se supor que seja da mesma ordem de grandeza que o produto da concentração na superfície pela taxa de transporte das espécies dissolvidas através do comprimento dos poros.

4.6.1. Construção do modelo de formação de lipossomas a partir de um filme lipídico seco depositado sobre uma superfície de vidro de um tubo capilar

Para construção do modelo de formação dos lipossomas, considera-se inicialmente a formação de um filme seco de lipídios com espessura L , que foi adsorvido no interior do tubo. O fenômeno de dissolução desse filme envolve inicialmente a penetração do líquido, formando uma frente que avança com o tempo, de comprimento L_p e tende a alcançar a espessura L . A medida que ocorre a penetração do líquido, uma segunda fase envolve a desintegração do filme que promove a dissolução dos lipídios para o seio da solução, permitindo a agregação e formação dos lipossomas. Esta frente de desintegração, L_d , também avança com o tempo e tende a alcançar L . Este processo ocorre em meio a um fluxo ascendente da fase aquosa. A Figura 12 ilustra o processo de formação de lipossomas, a partir de um filme lipídico seco formado no interior de um tubo.

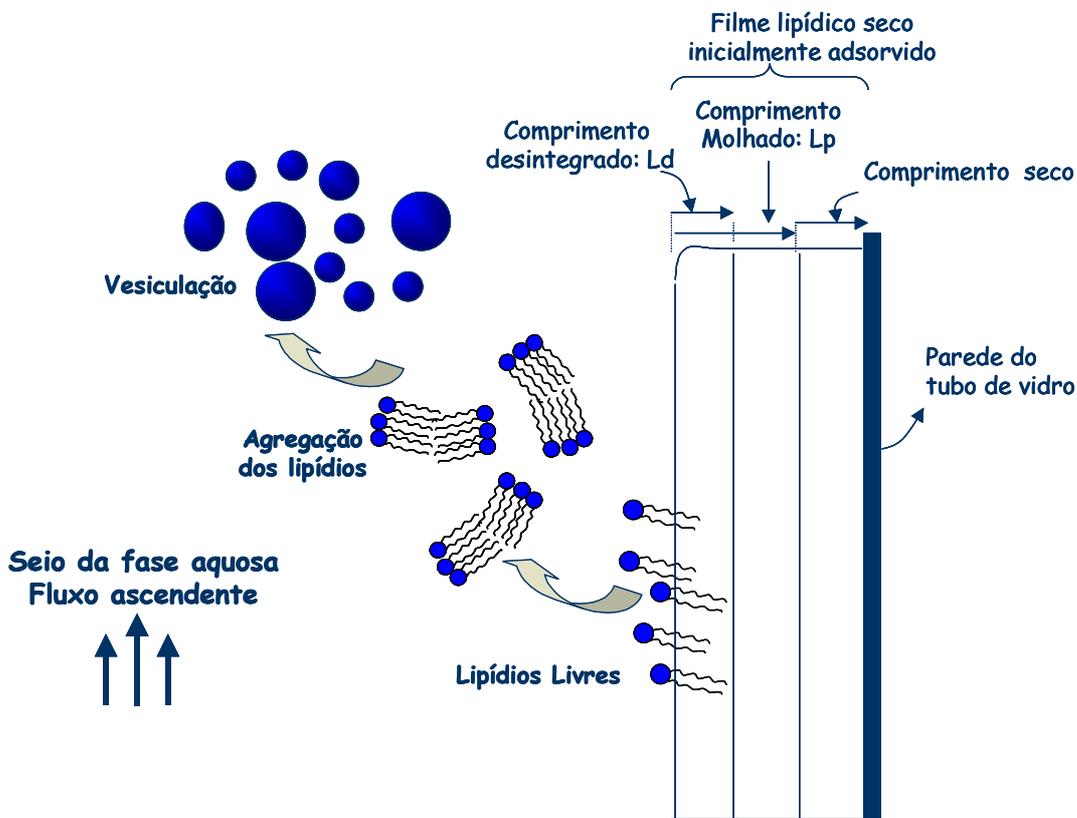


Figura 12: Representação unidimensional do processo de formação de lipossomas a partir da dessorção do filme lipídico seco, presente no interior de um tubo. Inicialmente ocorre a formação de uma frente de penetração de líquido, L_p (Comprimento referente à penetração de água que varia com o tempo); e a subsequente formação da frente de dissolução dos lipídios do filme lipídico seco, L_d (Comprimento referente à extensão desintegrada, que varia com o tempo). A dessorção dos lipídios para a fase aquosa permite que ocorra a agregação e formação dos lipossomas.

A penetração do líquido na porção não desintegrada do filme é expressa pela Equação 17.

$$L = L_p - L_d \quad \text{Equação 17}$$

onde,

L_p : comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido

L_d : comprimento do filme lipídico dissolvido

A velocidade da frente de penetração é dL_p/dt (Equação 18), que pode ser obtida através da diferenciação da Equação 17 e utilizando a definição da velocidade de penetração é apresentada na Equação 18:

$$\frac{dL_p}{dt} = \frac{dL_d}{dt} + \frac{L_p - L_d}{K} \cdot \frac{dK}{dt} + m \cdot K^{\frac{1}{m}} \cdot (L_p - L_d)^{\frac{m-1}{m}} \quad \text{Equação 18}$$

A massa desintegrada na superfície do filme é considerada uma contribuição dos fenômenos externo e interno de transferência de massa e também da taxa de consumo de moléculas de fosfolipídios para formar os lipossomas.

Carneiro, 2004, assumiu que a taxa de consumo de moléculas de fosfolipídios segue uma cinética de primeira ordem com relação à concentração de lipossomas ou vesículas, C_v .

A variação da massa de fosfolipídios com o tempo é dada pela Equação 19.

$$\frac{dm}{dt} = K_{ext} \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon}{\tau}\right) + K_{int} \cdot S_0 \cdot \frac{4 \cdot \varepsilon}{d_H} (L_p - L_d) - K_v C_v \quad \text{Equação 19}$$

onde,

C_v : concentração de vesículas

K_v : taxa de reação de produção de vesículas

O mesmo autor considerou também que a variação da concentração de vesículas com o tempo segue uma cinética representada pela Equação 20.

$$C_v(t) = \frac{K_t \cdot t}{K_t' + t} \quad \text{Equação 20}$$

A taxa de dissolução do filme lipídico, por outro lado, é proporcional à frente de desintegração dL_d/dt de acordo com a Equação 21.

$$\frac{dm}{dt} = \rho \cdot S_0 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \frac{dL_d}{dt} \quad \text{Equação 21}$$

Onde,

ρ : massa específica do sólido

A combinação das Equações 19, 20 e 21 constitui o modelo matemático representativo da penetração de água no filme, desintegração simultânea e formação mássica dos lipossomas.

A constante de penetração K pode ser representada de modo empírico através da Equação 22.

$$K = K_0 \cdot (1 + a \cdot t^n) \quad \text{Equação 22}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta sessão, os resultados e discussões são apresentados em cinco grandes grupos:

O primeiro grupo (item 5.1) refere-se à verificação da integridade do plasmídeo após complexação com lipídios catiônicos e subsequente incorporação através do método da desidratação e rehidratação (DRV). Esta análise foi realizada a fim de constatar que o plasmídeo não sofre alteração estrutural, perda do segmento que codifica a proteína hsp 65 ou degradação molecular que possa interferir na transfecção.

O segundo grupo (item 5.2) inclui caracterizações físico-químicas das formulações preparadas pelo método de Bangham, destinadas às avaliações *in vitro* e *in vivo*, como: (i) distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico (espalhamento de luz), (ii) determinação da razão de cargas para completa incorporação do DNA (eletroforese em gel de agarose), (iii) avaliação da transição de fases (DSC), (iv) carga de superfície (potencial zeta), (v) acessibilidade de sonda de fluorescência ao DNA incorporado nas estruturas lipídicas, (vi) morfologia e (vii) estabilidade física ao longo da estocagem e (viii) considerações sobre as etapas de produção dos lipossomas DRVs vazios.

Um resumo dos resultados dos ensaios biológicos para as estruturas lipídicas, realizados no CPT-RP: (i) *in vitro*: mensagem ao hsp65 e citotoxicidade e (ii) *in vivo*: dosagens de anticorpos e a recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb), constitui o terceiro grupo, apresentado no item 5.3, para fundamentar a escolha da estrutura lipídica mais promissora.

Com a estrutura lipídica mais promissora, um quarto grupo apresenta os resultados da inclusão na formulação do peptídeo sintético com seqüência de aminoácidos que ativa um transporte ativo através do envelope nuclear da célula e permite a entrada no núcleo celular. O item 5.4 descreve esta estrutura “ternária”, composta de lipossoma-DNA-peptídeo, e sua caracterização quanto ao diâmetro

hidrodinâmico e distribuição de tamanhos, carga de superfície, acessibilidade à sonda de fluorescência e morfologia.

O estudo do escalonamento do processo de obtenção dos lipossomas, incluindo a simulação da cinética de sua formação, está descrito no quinto grupo (item 5.5).

5.1. Integridade do plasmídeo nos processos de desidratação-rehidratação e complexação eletrostática

O plasmídeo pVAX-hsp65, destinado à vacinação gênica contra a tuberculose, é circular, foi obtido através de técnicas de engenharia genética e é composto basicamente por duas partes principais: (i) vetor comercial (pVAX1) e (ii) inserto que codifica uma proteína (*heat shock*) de 65 KDa obtida a partir do *Mycobacterium leprae*.

A integridade do plasmídeo pVAX-hsp65 foi avaliada utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose (descrita no item 4.5.1) para todas as estruturas lipídicas destinadas aos testes *in vitro* e *in vivo*. Para que esta análise seja possível, o DNA deve ser separado das estruturas lipídicas através do emprego de mistura de solventes orgânicos que promovem o rompimento das estruturas lipossomais e agregações lipídicas, favorecendo a migração dos lipídios para a fase orgânica, enquanto o DNA, insolúvel na fase orgânica, permanece na fase aquosa. A subsequente remoção da porção aquosa (superior) permite que o DNA seja purificado através da precipitação por etanol, conforme descrito no item 4.5.1.1. Em seguida, faz-se necessário a digestão com a enzima de restrição Bam HI, para que ocorra a linearização completa do DNA e permita identificação do tamanho do plasmídeo através da técnica de eletroforese em gel de agarose (item 4.5.1.2).

A Figura 13 apresenta a eletroforese em gel de agarose para o DNA separado das formulações do tipo lipoplexo (agregado lipídico complexado com

DNA), DRV-DNA (lipossomas DRVs complexados com DNA) e DRV(DNA) (DNA encapsulado em lipossomas DRVs), indicando que o inserto que codifica o antígeno hsp65 não se separa do vetor plasmideal (pVAX1).

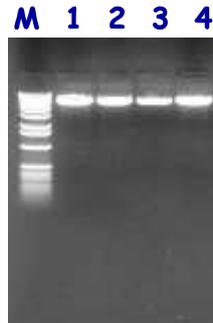


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do plasmídeo pVAX-hsp65 em estruturas lipídicas do tipo DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexos com razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 em solução salina (NaCl 0,9%). O plasmídeo foi separado de cada preparação lipídica através da adição de solvente orgânico (clorofórmio/metanol 9:1 v/v), purificado com etanol e digerido com enzima de restrição Bam HI. Plasmídeos padrão e extraído foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Cada linha representa: M) Marcador de 1Kb; 1) DNA separado de lipoplexos; DNA separado de 2) DRV-DNA, 3) DRV(DNA), 4) DNA padrão.

Sabe-se que o vetor e o inserto (hsp65) possuem cada um tamanho de 3kb e se houvesse qualquer fragmentação deste DNA devido ao emprego de vórtice ou às outras condições de processo (temperaturas, congelamento, complexação eletrostática, força iônica), várias bandas de DNA seriam detectadas no gel de agarose. A conclusão sobre a manutenção da integridade do plasmídeo é possível, pois para todas as estruturas, inclusive o DNA utilizado como padrão (DNA não processado), a eletroforese em gel de agarose apresentou apenas uma banda característica correspondente ao plasmídeo linearizado (vetor pVAX1+hsp65).

Este resultado indica que as etapas empregadas para o processamento das estruturas lipídicas não causam dano à vacina gênica (pVAX-hsp65). As principais etapas de obtenção de cada uma das estruturas lipídicas estão apresentadas na Figura 14.

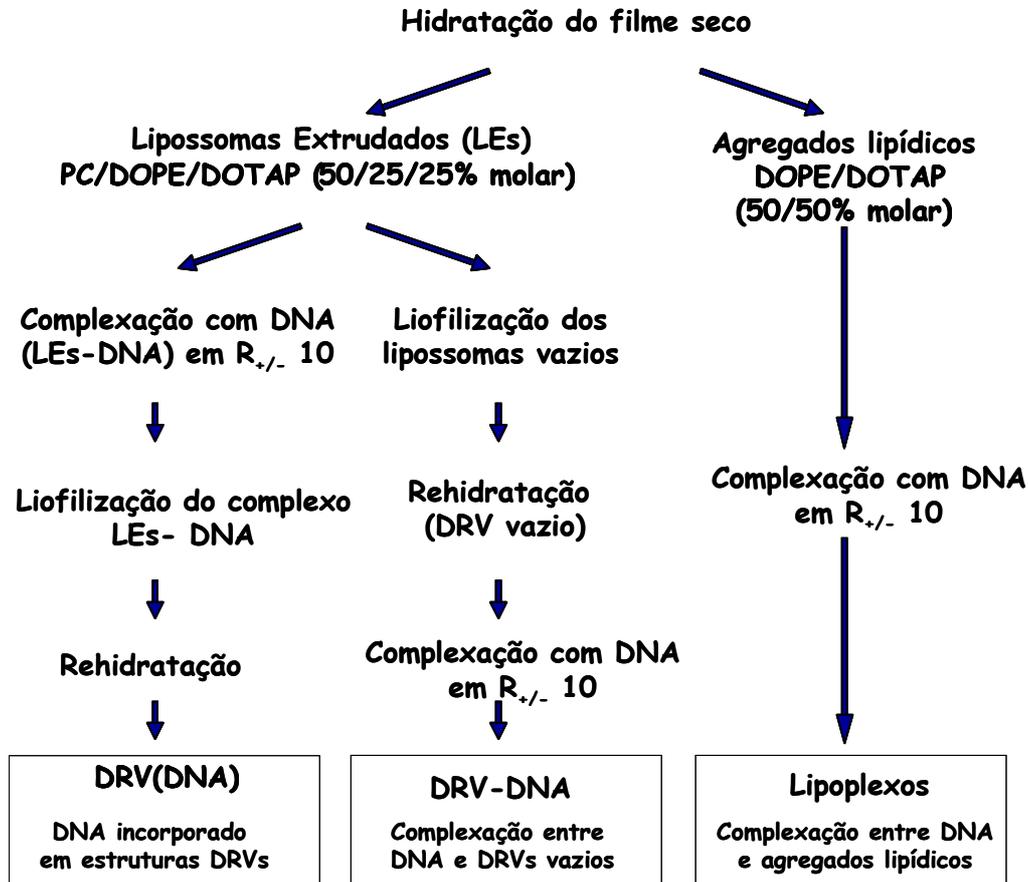


Figura 14: Esquema ilustrativo das rotas de preparação para DNA incorporado em estruturas DRVs (DRV(DNA)), DNA complexado com estruturas DRVs (DRV-DNA) e lipoplexos, com seus respectivos precursores.

O emprego de intensa agitação por meio de vórtice nas complexações eletrostáticas era considerado uma etapa crítica, pois a literatura reporta que estes complexos são formados apenas pela simples mistura entre lipossomas catiônicos e DNA (Almofti et al., 2003) ou através do emprego de vórtice em intensidade leve durante poucos segundos (Ferrari et al., 2001). Desta forma, a utilização de agitação vigorosa, bem como todas as demais etapas de processamento empregadas não promovem a desnaturação do plasmídeo, mantendo sua ação terapêutica.

É válido ressaltar que neste experimento a conformação do DNA não foi avaliada.

5.2. Caracterizações físico-químicas das estruturas destinadas aos ensaios *in vitro* e *in vivo*

As três estruturas lipídicas [DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexos] com formulações descritas no item 4.3, bem como as estruturas correspondentes que não possuem o DNA (denominadas aqui vazias) produzidas pelo método de Bangham, conforme descrito no item 4.4, foram caracterizadas e comparadas entre si. Estas caracterizações são úteis nas interpretações dos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

5.2.1. Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanhos e área superficial

O diâmetro médio hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos de todas as estruturas lipídicas estudadas estão apresentados nas Figuras 15 e 16 e os diâmetros médios das populações estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Diâmetros médios das populações encontradas na distribuição de tamanhos das estruturas lipídicas avaliadas

Estrutura Lipídica	Diâmetros médios das populações (nm±SD) (i)	
	População 1	População 2
Lipossomas compostos por EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar		
Lipossoma Hidratado	392 ± 75	1729 ± 398
Lipossoma Extrudado (LE)	136±17	
DRV vazio	175±11	932±408
DRV(DNA)	227±74	1036±328
DRV-DNA	653,5±204	2434±596
Agregados compostos por DOPE/DOTAP 50/50% molar		
Agregados lipídicos	396,5±49,1	1792,8±333,6
Lipoplexos	593±147,7	3110,4±174

(i) SD: Desvio padrão para número de 3 ou 4 amostras independentes.

(ii) Diâmetro avaliado pela intensidade de espalhamento de luz.

A evolução de diâmetros hidrodinâmicos e distribuição de tamanhos das estruturas contendo EPC/DOPE/DOTAP nas várias etapas da preparação dos DRVs é apresentada na Figura 15. Para os precursores dos DRVs, apresentados na Figura 15 A e B, a simples hidratação do filme seco de uma composição lipídica catiônica gerou uma distribuição bimodal, com populações de 392 ± 75 nm e 1729 ± 398 (Figura 15 A). Normalmente, suspensões lipossomais obtidas pelo método da Bangham produzem MLVs de tamanhos heterogêneos com tamanho entre 0,1 e 10 μ m (Szoka & Papahadjopoulos, 1980). Neste caso, a natureza catiônica dos lipossomas deve estar favorecendo a distribuição bimodal, permitindo boa reprodutibilidade das populações. É válido ressaltar que, neste caso, os lipossomas foram obtidos apenas em água, sem qualquer tampão ou NaCl. A extrusão em membrana de policarbonato com poro de diâmetro nominal de 100 nm produz lipossomas com distribuição unimodal, aqui denominados

lipossomas extrudados, LEs (Figura 15 B), com diâmetro médio hidrodinâmico igual a 136 ± 17 nm.

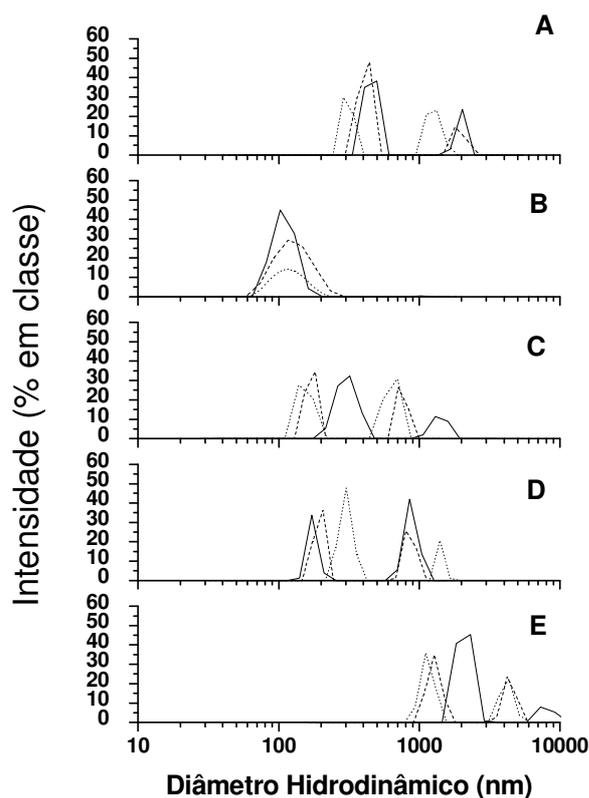


Figura 15: Distribuição de tamanho dos lipossomas catiônicos compostos por PC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar) nas várias etapas de processamento para formação das estruturas DRVs. A) Após a hidratação do filme seco com água padrão para injeção. B) Lipossomas extrudados em membranas de policarbonato, de poros com diâmetro nominal de 100 nm. C) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV em solução salina (NaCl 0,9%). D) Lipossomas produzidos pelo método DRV encapsulando DNA a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%). Cada gráfico apresenta a distribuição de tamanhos de três amostras independentes. E) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV e complexados com DNA a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%).

Os lipossomas extrudados foram, então, liofilizados e rehidratados em solução salina (NaCl 0,9%) sem a presença de DNA, a fim de se conhecer o comportamento de agregação dos lipídios na rehidratação (Figura 15 C). A solução salina foi empregada a fim de garantir meio de dispersão isotônico adequado para a aplicação como vacina *in vivo*. A distribuição bimodal, com populações de 175 ± 11 e 932 ± 408 nm, ligeiramente menor que à dos lipossomas hidratados pelo método do filme seco em água (Figura 15 A), sugere maior compactação da estrutura lipossomal, inerente ao processo DRV que promove a fusão dos lipossomas pela secagem (liofilização).

A encapsulação de DNA na estrutura DRV [DRV(DNA)] também gerou uma distribuição com populações de diâmetros médios de 227 ± 74 e 1036 ± 328 nm (Figura 15 D), muito semelhante à estrutura DRV vazia, sugerindo que a quantidade de DNA presente na estrutura não interfere significativamente na agregação lipídica. No entanto, quando ocorre a complexação entre DRV vazio e DNA, gerando as estruturas DRV-DNA, as populações sofrem variação significativa do diâmetro hidrodinâmico, $653,5\pm 204$ e 2434 ± 596 nm (Figura 15 E). Este aumento significativo de tamanho das populações quando comparado às estruturas DRV vazio (Figura 15 C) e DRV(DNA) (Figura 15 D), indicando que a complexação eletrostática permite o posicionamento do DNA nas regiões mais externas dos lipossomas, conforme já investigado por Perrie et al., 2000 e Pupo et al., 2005.

É interessante ressaltar que a estrutura DRV-DNA inicialmente estudada por Perrie & Gregoriadis, 2000 apresentou diâmetro da ordem de 5 a $20\mu\text{m}$, faixa significativamente maior que a encontrada nesta pesquisa. Esta diferença deve estar associada ao controle da temperatura em 4°C e agitação intensa em vórtice durante a complexação.

Como a natureza dos agregados lipídicos também é catiônica, uma distribuição bimodal também é encontrada para a composição DOPE/DOTAP 50/50% molar quando produzida em solução salina 0,9% (Figura 16 A), com diâmetros médios das populações de $396,5\pm 49,1$ e $1792,8\pm 333,6$. A

complexação deste agregado com o DNA fornece novamente outra distribuição bimodal (Figura 16 B), cujos diâmetros médios hidrodinâmicos são $593 \pm 147,7$ e $3110,4 \pm 174$.

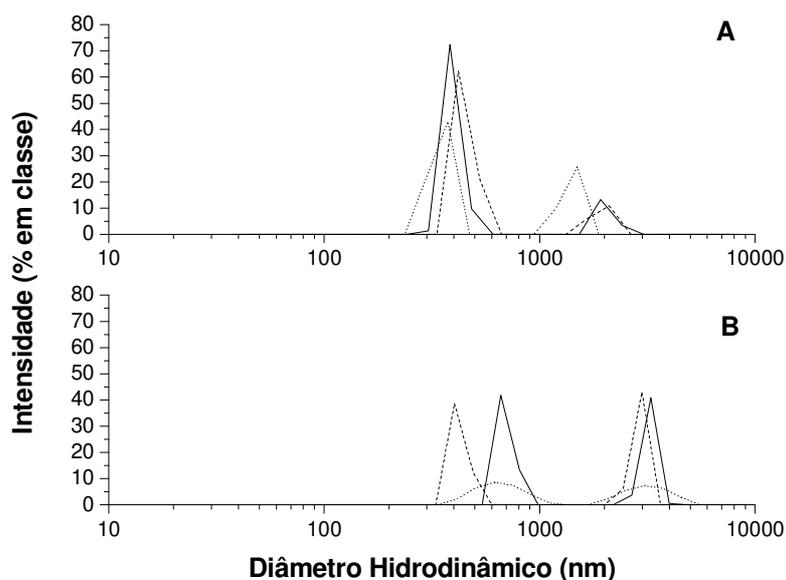


Figura 16: Distribuição de tamanho das estruturas lipídicas formadas por DOPE/DOTAP 50/50% molar em solução salina 0,9%. A) Agregado lipídico. B) Lipoplexo composto por agregados lipídicos e DNA, razão de cargas 10. Cada gráfico apresenta a distribuição de tamanhos de três amostras independentes.

Outro parâmetro usado para comparar o empacotamento entre as diferentes estruturas lipídicas é a área superficial por unidade de massa total (As/M). Conforme constatado anteriormente, a distribuição de tamanhos dos agregados formados por lipídios catiônicos é bimodal; porém, a título de comparação entre as diferentes construções, calculou-se o diâmetro médio populacional ponderado pela porcentagem de cada uma das duas populações. A partir deste diâmetro médio, pode-se calcular a área superficial por unidade de massa total (As/M) das estruturas, considerando geometria esférica e distribuição unimodal, conforme descrito no item 4.5.3. A Tabela 7 apresenta os diâmetros médios ponderados para as diferentes estruturas lipídicas e os valores de As/M.

Quando o DNA é incorporado em cada tipo de estrutura, observou-se que o diâmetro médio populacional e a área superficial por unidade de massa total (As/M) tiveram comportamentos similares.

Tabela 7: Diâmetro médio e área superficial por unidade de massa das várias estruturas lipídicas

Estruturas Lipídicas	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm ± SD) (i)	Área Superficial (10 ³ nm ² /mg ± SD) (ii)
<i>EPC/DOPE/DOTAP – DRV_s</i>		
vazio	447 ± 76	26 ± 9
Complexando DNA: DRV-DNA (iii)	1844 ± 125	450 ± 60
Encapsulando DNA: DRV(DNA) (iii)	641 ± 87	54 ± 15
<i>DOPE/DOTAP – Agregados lipídicos</i>		
vazio	696 ± 30	30 ± 11
Lipoplexo (iii)	1762 ± 101	887 ± 102

(i) SD: desvio padrão, para o número de amostras (N) variando entre 3 e 5;

(ii) SD: calculado a partir da teoria da propagação de erros, Taylor (1997);

(iii) Todas as estruturas lipídicas com o DNA incorporado estão formuladas a uma razão de cargas ($R_{+/-}$) 10, utilizada para os ensaios *in vivo*.

Dentre os lipossomas formados a partir da desidratação-rehidratação (DRV), a presença do DNA promoveu menor As/M na estrutura DRV(DNA), indicando maior grau de compactação. A maior As/M e diâmetro médio ocorreu para DRV-DNA, evidenciando a existência de diferenças significativas na distribuição do DNA em relação ao DRV(DNA). Possivelmente essa diferença se deva à incorporação do DNA nas camadas mais externas no DRV-DNA.

Os valores mais elevados de As/M foram encontrados para os lipoplexos, sendo praticamente o dobro da área superficial encontrada para DRV-DNA. Apesar dos diâmetros hidrodinâmicos médios serem muito próximos, as

formulações para os lipoplexos apresentaram quantidade de lipídios menores (ausência de EPC). Nesse último caso, este comportamento pode estar associado à característica polimórfica destes lipossomas, pois possuem a capacidade de mudar sua estrutura de acordo com o tipo de interação (Lasic, 1997) que pode levar a uma instabilidade termodinâmica destes agregados, gerando estruturas de várias formas e com formações que variam com o tempo, como relatado por Bordi et al., 2003. Essas instabilidades surgem em decorrência dos agregados lipídicos possuírem somente PE e o lipídio catiônico DOTAP, que possuem em suas moléculas a mesma cauda hidrofóbica, apresentando diferenças apenas nas cabeças polares. Sabe-se que o PE em condições fisiológicas tende a agregar-se na forma hexagonal inversa, devido ao pequeno tamanho da cabeça polar em relação à grande área ocupada pela cauda hidrofóbica (Litzinger & Huang, 1992). Para o caso do lipídio catiônico, DOTAP, a área da sua cabeça polar é menor que o DOPE (Hirsch-Lerner & Barenholz, 1998). Estas características favorecem a formação de agregados menos estáveis quando comparados com as estruturas DRV-DNA e DRV(DNA), que contêm EPC que conhecidamente agrega-se em bicamadas ordenadas. Evidências indiretas da estabilidade das estruturas foram observadas a partir de um simples teste de incubação à 37°C, sob agitação recíproca. Os agregados lipídicos e os lipoplexos precipitaram em apenas uma hora, enquanto DRVs permaneceram dispersos em solução.

Em todos os casos, observa-se que apesar da baixa concentração de DNA em relação aos lipídios (massas na relação 1:200 DNA:lipídio total, aproximadamente), os diâmetros médios das estruturas contendo DNA foram sempre maiores que as respectivas estruturas precursoras vazias, indicando que a presença do DNA altera as estruturas lipídicas formadas.

5.2.2. Incorporação do DNA nas estruturas

A verificação da incorporação de DNA nas diferentes estruturas lipídicas foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose (conforme descrito

no item 4.5.2). Nesta técnica, o DNA ligado ao complexo lipídico não migra no gel pelo princípio de exclusão de tamanho, de modo que apenas o DNA não incorporado no agregado (livre na solução) irá movimentar-se no gel sob ação da tensão elétrica. Assim, a visualização de bandas que migraram após a corrida eletroforética indica a presença de DNA livre.

5.2.2.1. Incorporação do DNA nas estruturas lipídicas para $R_{+/-}$ 10

A Figura 17 mostra a fotografia do gel de agarose para DRV-DNA e DRV(DNA) a $R_{+/-}$ 10. A linha 1 representa o DNA livre (pVAXhsp65), as linhas 2 e 3 são as construções DRV(DNA) e DRV-DNA, respectivamente. Como nestas linhas 2 e 3 não houve identificação de banda semelhante à linha 1, tem-se que não existe DNA livre nestas soluções lipídicas, constatando-se que todo o DNA está incorporado nas respectivas estruturas.



Figura 17: Gel de agarose 0,75% para DRV-DNA (Lipossomas DRVs complexados com DNA) e DRV(DNA) (Lipossomas encapsulando DNA) com razão de cargas ($R_{+/-}$) 10, compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (percentagem molar) em solução salina 0,9%. Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) DRV(DNA) $R_{+/-}$ 10; 3) DRV-DNA $R_{+/-}$ 10.

O mesmo comportamento ocorreu com lipoplexos obtidos em $R_{+/-}$ 10 (resultado não apresentado). Estes resultados demonstram que a formulação estabelecida (Tabela 3, item 4.3) para os testes *in vitro* e *in vivo*, utilizando razão

de cargas ($R_{+/-}$) 10 permite a total incorporação do DNA nas estruturas, garantindo que todo o DNA será veiculado através das estruturas lipídicas.

5.2.2.2. Razão entre cargas para completa incorporação do DNA

A mesma técnica de eletroforese em gel de agarose foi empregada para a determinação da quantidade relativa de DNA livre ou incorporado nas estruturas lipídicas em função da razão de cargas, visando a identificação da $R_{+/-}$ em que ocorre completa incorporação do DNA e comparação entre as estruturas LEs, DRV e agregado lipídico.

A Figura 18 apresenta as fotografias dos géis de agarose para as estruturas do tipo LE (lipossoma extrudado), DRV, agregado lipídico complexadas com o DNA, na qual identificou-se a razão de cargas para incorporação do DNA, sendo estes valores resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: Razão de cargas ($R_{+/-}$) para completa incorporação do DNA nas estruturas lipídicas.

Estrutura	$R_{+/-}$ que promove total incorporação de DNA
LE (i)	1,5
Agregado lipídico	1,5
DRV vazio	4,0

(i) *Lipossoma extrudado.*

Na Tabela 8, tem-se que a razão de cargas 1,5 identificada para LEs foi a mesma encontrada para os agregados lipídicos. Os lipossomas extrudados, com diâmetro médio de 136 nm e distribuição unimodal, devido ao seu tamanho, permitem exposição de maior quantidade de cargas positivas, permitindo que razões de carga 1,5 já promovam a incorporação total do DNA nestas estruturas. No caso dos agregados lipídicos, que são estruturas que não possuem o PC de

ovo em sua estrutura, apesar de maior tamanho (396,5 e 1792,8 nm), permite também que nesta razão de cargas ($R_{+/-}$ 1,5) todo o DNA já esteja complexado. Este comportamento mostra a instabilidade da estrutura lipídica contendo somente DOPE/DOTAP para complexar-se com o DNA.

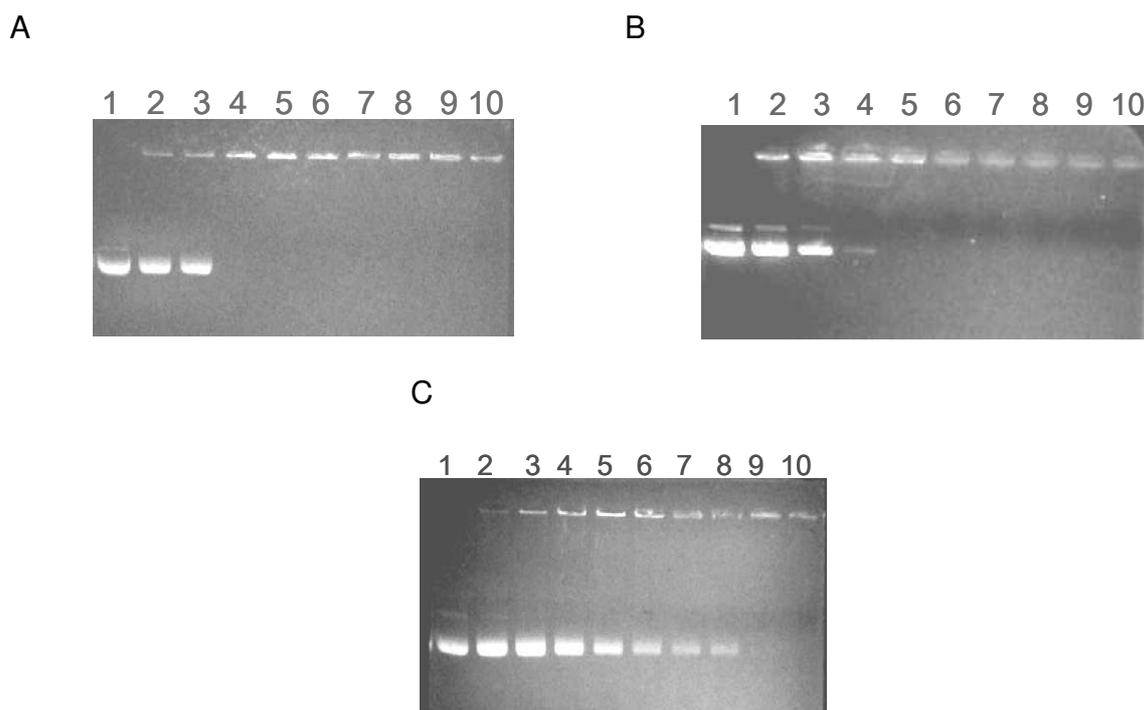


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose para várias estruturas lipídicas catiônicas obtidas em solução salina (NaCl 0,9%) e complexadas com DNA durante 10 minutos à temperatura ambiente, em várias razões de cargas ($R_{+/-}$): A) Complexos Lipossomas extrudados-DNA (LEs-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. B) Lipoplexos (Agregados lipídicos-DNA compostos por DOPE/DOTAP 50/50% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. C) DRV-DNA (Lipossomas do Tipo-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5.

Quando DRVs são utilizados para complexação com DNA, verifica-se que $R_{+/-}$ necessário para promover a incorporação completa do DNA é 4. Comparando este valor com obtido para LEs, que possuem mesma composição lipídica, diferenciando-se somente no diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos, tem-se que, para estruturas que possuem o lipídio estrutural EPC, o tamanho e a distribuição dos lipídios na estrutura são fatores importante na determinação da razão de cargas para incorporação do DNA. Através de microscopia eletrônica de criofatura Perrie et al., 2001, tiveram indicação de que as estruturas DRV são multilamelares e, assumindo esta hipótese, a elevada razão de cargas pode ser explicada pela presença de lipídio catiônico nas lamelas mais internas do lipossoma, dificultando o contato inicial com o DNA e sua subsequente complexação. Como o EPC age de modo estrutural, estabilizando a agregação lipídica em bicamadas, torna-se mais difícil para o DNA complexar-se com os lipídios catiônicos presentes nas camadas mais internas.

Estruturas do tipo DRV(DNA) não tiveram a razão de cargas avaliada para este sistema; porém, investigações exploratórias utilizando outro plasmídeo (pcDNA3-hsp65) em tampão TRIS-Edta demonstraram capacidade de incorporação de DNA em razões de carga de até 3,5.

A grande diferença entre a razão de cargas utilizada nas preparações lipídicas para os testes *in vitro* e *in vivo* ($R_{+/-}$ 10) e as razões de carga na qual se promove a incorporação completa do DNA (Tabela 8) identifica uma grande flexibilidade do sistema para ajustes de concentração de DNA, caso se verifique a necessidade de alterar a quantidade de DNA nas formulações.

5.2.3. Carga superficial

Potencial zeta (ζ) é uma medida eletrocinética que envolve efeitos de movimento e fenômeno elétrico na dupla camada (Stern e difusa). Estas camadas são formadas pela presença de contra-íons ao redor da superfície coloidal para neutralizar suas cargas. A camada Stern é a mais próxima e a primeira a envolver

o colóide, tendo como principal característica uma grande rigidez, pois é formada apenas pelos contra-íons. A camada difusa também é formada por contra-íons que estão em equilíbrio dinâmico, no qual tentam se aproximar do colóide, sofrendo repulsão pela presença da camada Stern. Esta variação de contra-íons que ocorre entre a superfície do colóide e o seio do líquido promove a formação de um potencial elétrico, que é denominado potencial de superfície. Assim, se um campo elétrico é aplicado, o fenômeno de eletroforese ocorre, pois a partícula coloidal irá movimentar-se, com mobilidade que depende do potencial elétrico criado entre a camada que envolve a partícula e o seio do líquido, além da viscosidade, da constante dielétrica do meio e da intensidade do campo elétrico. Neste contexto, o potencial zeta é a medida de um fenômeno de superfície, definido como potencial elétrico no ponto que separa a camada Stern e difusa e é dependente também da mobilidade eletroforética.

A fim de conhecer a carga da superfície das estruturas lipídicas, realizou-se a medida do potencial zeta (ζ). A Tabela 9 apresenta os valores de ζ para as estruturas lipídicas obtidas em R_{+/-} 10.

Tabela 9: Valores de potencial zeta das estruturas lipídicas obtidas em R_{+/-} 10

Estruturas Lipídicas	Potencial Zeta-ζ (mV \pmSD) (i)
DRV vazio	+26,9 \pm 2,4
DRV-DNA (R _{+/-} 10)	+27,3 \pm 2,3
DRV(DNA) (R _{+/-} 10)	+32,8 \pm 4,0
Agregado lipídico	+48,3 \pm 3,2
Lipoplexo (R _{+/-} 10)	+48,6 \pm 2,5

(iii) SD: Desvio padrão para 3 amostras.

(iv) Nas medidas foram usadas solução salina 0,9% como meio diluente

Todas as estruturas lipídicas produzidas em NaCl 0,9% são catiônicas pois apresentam valores de ζ positivos. A presença do lipídio estrutural EPC nos lipossomas DRVs promove diminuição significativa do valor do potencial zeta devido, provavelmente, à maior internalização dos lipídios que ocorre tanto pela sua agregação com o DOPE e DOTAP, quanto pela fusão após a rehidratação e complexação com o DNA.

No caso dos agregados lipídicos, os lipídios catiônicos tornam-se mais expostos na superfície coloidal, comparados aos DRVs.

A presença de DNA na razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 não influencia significativamente na característica catiônica do DRVs e lipoplexos. Este fato indica que a superfície destes colóides mantém-se catiônica, com valores de densidade de carga na mesma ordem de grandeza quando o DNA é simplesmente complexado (DRV-DNA e lipoplexos) ou então incorporado [DRV(DNA)] sugerindo, então, juntamente com a avaliação eletroforética, que o DNA presente nestas estruturas está totalmente internalizado.

5.2.4. Transição de fases

A técnica de calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para avaliar a influência da composição lipídica e da presença do DNA na temperatura de transição de fases das diferentes estruturas lipídicas.

A preparação das amostras consistiu de uma etapa prévia de liofilização e outra de acondicionamento em dessecador, sob vácuo e refrigeração. Avaliações prévias, apresentadas no Anexo III, demonstraram que não houve necessidade de apagar o histórico térmico.

Os termogramas para as estruturas lipídicas vazias e com o DNA incorporado estão na Figura 19, sendo possível a identificação das principais temperaturas de transição e os respectivos valores de entalpia, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Temperatura de transição de fases, variação de entalpia e entropia para as diferentes estruturas lipídicas obtidas através de calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Estruturas	Temperatura de transição de fases	ΔH (i)	ΔS (ii)
	(°C)	(cal/mol)	(cal/mol.K)
DRV vazio	12.97	2010	7,03
DRV(DNA) (iii)	12.87	2296	8,03
DRV-DNA (iii)	14.41	3393	11,80
Agregados lipídicos	1.22	4485	16,36
Lipoplexo (iii)	-2.41	2641	9,76

(i) Variação de entalpia;

(ii) Variação de entropia;

(iii) Todas as estruturas contendo DNA estão em razão de cargas $R_{+/-}$ 10.

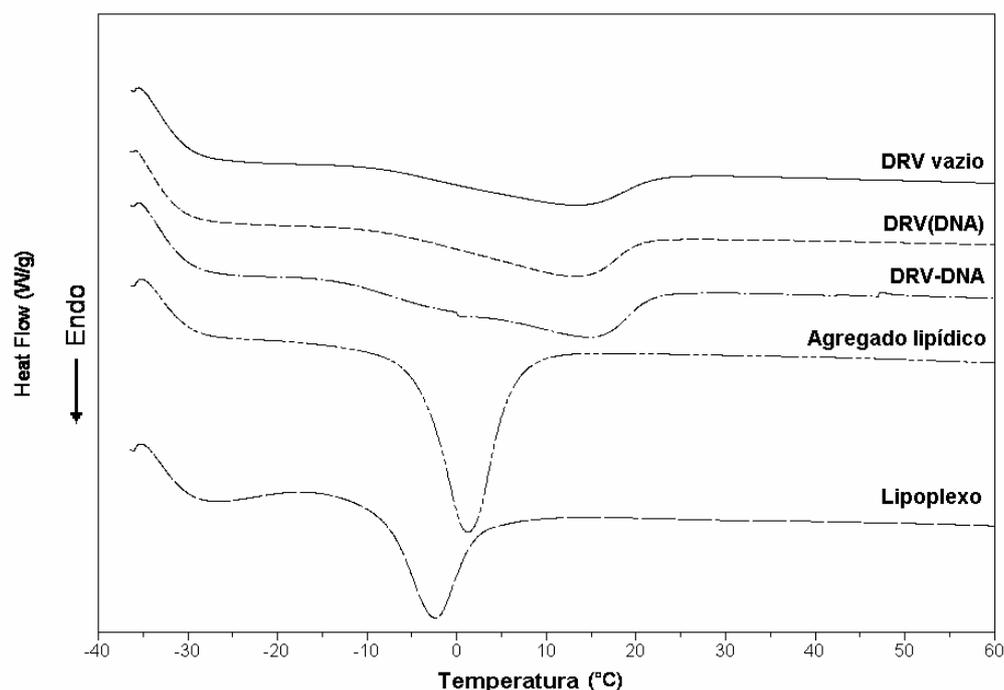


Figura 19: Termograma comparativo das várias estruturas lipídicas. As composições lipídicas são: (i) DRV vazio, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar. (ii) DRV(DNA) e DRV-DNA, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar, $R_{+/-}$ 10. (iii) Agregado lipídico, DOPE/DOTAP 50/50 % molar. (iv) Lipoplexo, DOPE/DOTAP 50/50 %molar, $R_{+/-}$ 10. Taxa de aquecimento de 10°C/minuto.

5.2.4.1. Influência da composição lipídica

As estruturas DRV (Figura 19) tiveram transição de fases ocorrendo em maior faixa de temperatura, gerando bandas mais largas e de transição assimétrica quando comparado aos agregados lipídicos e lipoplexos. Este tipo de comportamento, já reportado por Mabrey & Sturtevant em 1976, é causado pela presença do EPC, que é de origem natural e contém uma mistura de fosfolídeos com ácidos graxos variados, conforme já apresentado no item 3.2.2 (Figura 4).

Já os termogramas referentes aos agregados lipídicos e lipoplexos, que contêm apenas DOTAP e DOPE como lipídios em sua composição, apresentam pico mais definido devido, provavelmente, à maior pureza, pois se tratam de lipídios sintéticos.

As temperaturas de transição de fases para DRV vazio e agregados lipídicos foram 12,97 e 1,22°C, respectivamente. Esta variação de temperatura de transição de fases ocorre devido às diferenças de composições lipídicas encontrada em cada estrutura refletindo, conseqüentemente, em diferenças na forma de agregação de cada estrutura.

DRVs vazios, que possuem os lipídios EPC, DOPE e DOTAP (em fração molar 0,5, 0,25 e 0,25, respectivamente) tendem a se agregar bicamada, pela própria característica do EPC, que é um lipídio que possui cadeias acila ricas em C16 e C18 saturadas (45%) e monoinsaturadas (34%), e que permitem maior interação de contato cadeia-cadeia lateral com atração de van der Waals, tornando a bicamada mais organizada. Além disso, Koltover et al., 1998, estudou a capacidade do co-lipídio DOPE em induzir a transição da fase líquido cristalino para hexagonal inversa ($L^c_\alpha \rightarrow H^c_{II}$) pelo controle espontâneo da curvatura da monocamada lipídica. Em sua pesquisa, formulações contendo o fosfolipídio DOPC (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina), DOPE e DOTAP na qual a fração mássica de DOPE é menor que 0,41, a agregação ocorre em bicamada na fase L^c_α (lamelar). Nestas circunstâncias, as temperaturas de transição de fases

identificada no termograma da Figura 19 para as estruturas do tipo DRV referem-se, provavelmente, à transição de fases gel para líquido cristalino, normalmente identificada como T_m .

No caso dos agregados lipídicos, a temperatura de transição de fases tem a contribuição apenas dos lipídios DOPE e DOTAP, ambos em fração molar 0,5. No mesmo estudo realizado por Koltover et al., 1998, formulações lipídicas nestas condições, em água, tendem a formar simultaneamente duas fases, a hexagonal inversa (H^c_{II}) e a lamelar (L^c_{α}). Desta forma, a temperatura de transição de fases pode estar relacionada à transição de fases líquido cristalino para hexagonal inversa ($L^c_{\alpha} \rightarrow H^c_{II}$).

A presença do EPC nas estruturas DRV vazias, permite maior interação hidrofóbica, gerando menor variação de entalpia ($\Delta H = 2010$ cal/mol), enquanto a presença somente de DOPE e DOTAP para os agregados lipídicos diminui estas interações, contribuindo para uma maior variação de entalpia ($\Delta H = 4485$ cal/mol). As variações de entropia (ΔS) para DRV vazio e agregados lipídicos foram 7,03 e 16,36 cal/(mol.K), respectivamente. O maior valor de ΔS para os agregados lipídicos indica maior desorganização desta estrutura, possivelmente pela presença de lipídios na forma hexagonal inversa.

5.2.4.2. Influência da presença do DNA

Quando o DNA é encapsulado [DRV(DNA)], o valor de T_m é 12,87°C, mantendo-se muito próximo ao valor da respectiva estrutura DRV vazia ($T_m = 12,97^\circ\text{C}$). Isto sugere que o DNA não está provocando grandes perturbações na organização da bicamada lipídica, indicando que a desidratação e rehidratação, no qual ocorre fusão entre as vesículas, permite acomodação do DNA possivelmente na fase aquosa entre as lamelas, em uma configuração do tipo sanduíche, como proposto por Rädler et al., 1997. Esta hipótese também é consistente com os valores de variação de entalpia e entropia, pois estes não sofrem alterações

significativas, indicando que a presença do DNA não altera significativamente as interações hidrofóbicas e a organização da bicamada.

A simples complexação do DNA com DRV's vazios gera estruturas do tipo DRV-DNA. Neste caso, observa-se um aumento de T_m para $14,41^\circ\text{C}$, sendo maior que a T_m da respectiva estrutura vazia ($T_m = 12,97^\circ\text{C}$) e o DRV(DNA) ($T_m = 12,87^\circ\text{C}$) (Tabela 10). Comportamento similar foi encontrado por Kõiv et al., 1994, em estudos envolvendo a complexação entre lipossomas contendo DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina)/esfingosina e DNA, onde DMPC é um lipídio zwitteriônico, e a esfingosina que é normalmente protonada em pH fisiológico, confere caráter catiônico. O autor verificou inicialmente que o DNA não interfere na temperatura de transição de fases dos lipossomas contendo somente DMPC. Porém, quando a esfingosina é inserida na bicamada, a complexação destes lipossomas com DNA altera a T_m . Lipossomas MLVs compostos por DMPC/esfingosina (79/21% molar) possuem $T_m = 29,1^\circ\text{C}$. Quando estas estruturas são complexadas com pequenas quantidades de DNA (0,06 a 0,1 nucleotídeos/esfingosina), verifica-se que T_m aumenta para $32-37^\circ\text{C}$, ocorrendo também elevação da entalpia. Quando maiores quantidades de DNA são utilizadas, começa a ocorrer um decréscimo da entalpia e da transição de fases e novos picos aparecem indicando separação de fases. Segundo o autor, quando a concentração de DNA aumenta, a fase homogênea DMPC/esfingosina vai se tornando gradativamente rica em DMPC, devido à formação de domínios contendo a esfingosina ligada ao DNA. Isto modifica T_m para valores mais próximos da temperatura de transição de fases do DMPC puro. Quando são adicionadas quantidades maiores de DNA, novos picos podem ser formados, indicando a formação de novos domínios. Além disso, a carga líquida presente na superfície externa do colóide pode induzir "flip-flop" da esfingosina entre as bicamadas, enriquecendo este lipídio na superfície externa dos lipossomas (Kõiv et al., 1994).

Este mesmo comportamento de T_m também foi identificado por Subramanian et al., 2000, em estudos sobre a caracterização de lipossomas compostos por DMPC/BPDAB (95/5% molar), onde BPDAB refere-se a brometo

de bis[2-(11- fenoxundecanoato)etil]dimetil amônia. Os autores identificaram que mesmo um pequeno aumento da concentração de DNA eleva a temperatura de transição de fases, também sugerindo que o DNA condensa o lipídio catiônico, formando domínios lipídicos ordenados que alteram T_m .

Análise semelhante pode ser feita para o caso da complexação entre DRV e DNA neste trabalho. Inicialmente existe grande quantidade de DNA na superfície, formando uma carga negativa líquida na superfície do DRV, induzindo o “flip flop” do lipídio catiônico DOTAP para as camadas mais externas da estrutura. Desta forma, o enriquecimento das camadas mais externas com o DOTAP, promove uma reorganização das bicamadas mais internas e permite que o teor de PC seja elevado, proporcionando melhor empacotamento. Sabendo que a maior contribuição para a transição de fases é dada pela isomerização *trans-gauche* das cadeias acila e que uma maior organização da bicamada e contato cadeia-cadeia permite a elevação de T_m , o melhor empacotamento das bicamadas mais internas ocasionará elevação de T_m (Mabrey-Gaud, 1981). Como a quantidade de DNA é pequena ($R_{+/-} 10$), não há formação de domínios específicos e, por isso, outros picos diferentes não são detectados nos termogramas. A comparação entre as entalpias e entropias da estrutura DRV-DNA com o seu precursor vazio (DRV vazio), revela que valores crescentes de temperatura são requeridos para mudança de fase quando o DNA é incorporado nas estruturas.

Os agregados lipídicos apresentaram temperatura de transição de fases 1,22°C (Tabela 10). Quando estas estruturas são complexadas com o DNA, a temperatura de transição de fases cai para -2,41°C. Isto indica que a organização no empacotamento lipídico sofreu perturbações, diminuindo as interações de atração de van der Waals.

Hirsch-Lerner & Barenholz, 1998 analisaram a interação entre agregados lipídicos, compostos por DOPE/DOTAP 1:1 e DNA e estabeleceram que dois mecanismos podem ocorrer, considerando inicialmente que a interação do DNA ocorre com a cabeça polar do lipídio catiônico, na região próxima da interface lipídio/água. Este efeito é mostrado na Figura 20, na qual aparece pronunciado no

primeiro mecanismo descrito para $R_{+/-} > 1,66$, onde ocorre excesso de lipídio catiônico. Neste caso, o DNA adsorve na superfície da membrana catiônica e induz a formação de domínios ordenados na bicamada (separação isotérmica de fase), perturbando o equilíbrio de empacotamento dos lipídios. A formação de domínios de condensação do lipídio com o DNA promove a formação de defeitos no empacotamento, permitindo maior exposição de água para a região hidrofóbica. Este fenômeno também pode explicar o aumento de tamanho, a fusão e heterogeneidade de formas destas estruturas (Gershon et al., 1993, Eastman et al., 1997, Zabner et al., 1995). Quando ocorre excesso de DNA ($R_{+/-} < 1$), o nível de neutralização do lipídio é muito maior, não havendo a formação de domínios ordenados e defeitos de empacotamento da membrana e toda a superfície interage homoganeamente com o DNA (Figura 20). Este fenômeno reduz a exposição da região hidrofóbica à água. A ausência de defeitos é justificada pela manutenção dos diâmetros hidrodinâmicos após a complexação destes agregados com o DNA em $R_{+/-} < 1$ (Hirsch-Lerner & Barenholz, 1998).

Neste contexto, as estruturas do tipo agregado lipídico e lipoplexo permitem maior desorganização da bicamada lipídica (refletida pela coexistência das fases lamelar e hexagonal inversa), provocando grande influência na temperatura de transição de fases, pela razão entre cargas ser maior que 1,66. A incorporação do DNA nos agregados lipídicos para a formação dos lipoplexos causa diminuição dos valores de variação de entalpia e entropia para níveis equivalentes aos da estruturas DRV-DNA e DRV(DNA).

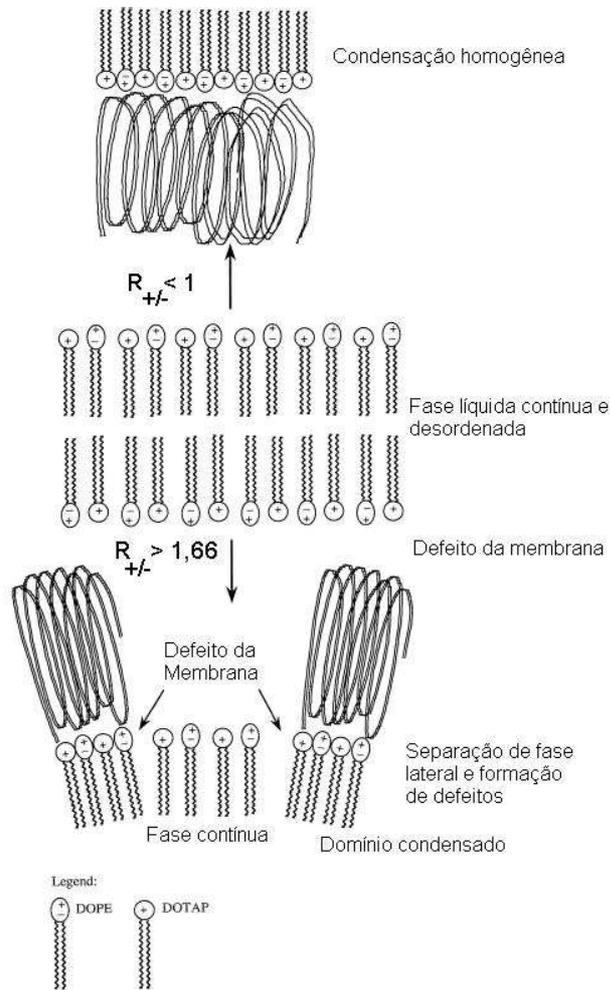


Figura 20: Diagrama esquemático descrevendo os mecanismos de organização da bicamada lipídica (DOPE/DOTAP 1:1) quando complexado com o DNA em diferentes razões de carga, $R_{+/-} < 1$ e $R_{+/-} > 1,66$ (adaptado de Hirsch-Lerner & Barenholz, 1998)

5.2.5. Acesso da sonda de fluorescência (PicoGreen) ao DNA

Outra forma de caracterização das estruturas lipídicas é através do emprego de sondas de fluorescência, como o PicoGreen. Esta sonda é específica para quantificação de DNA dupla fita (dsDNA); porém, o mecanismo de ligação

deste reagente ainda não é totalmente claro, ocorrendo possivelmente sua intercalação no DNA (Singer et al., 1997). Os espectros de emissão de fluorescência do reagente PicoGreen após ligação com DNA dupla fita (dsDNA), DNA fita simples (ssDNA) e RNA estão ilustrados na Figura 21, indicando a especificidade desta sonda ao DNA dupla fita.

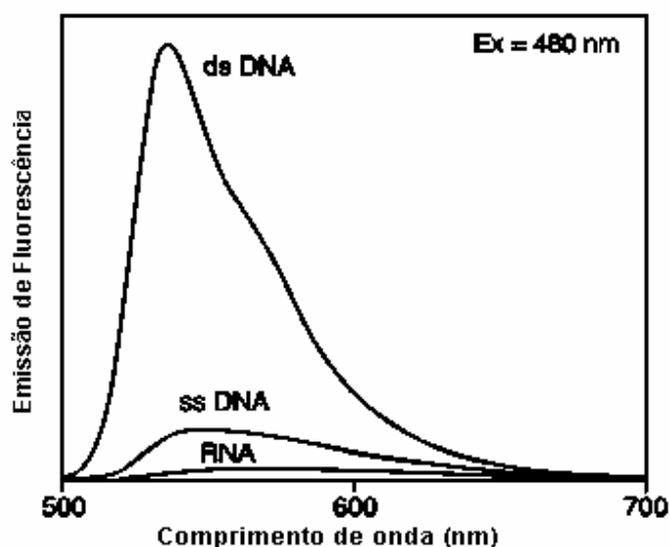


Figura 21: Espectros de fluorescência da sonda PicoGreen nas moléculas do tipo DNA dupla fita (dsDNA), DNA fita simples (ssDNA) e RNA. As amostras foram excitadas em comprimento de onda de 480 nm. (<http://www.probes.com/handbook/figures/1549.html>, 2004)

Quando esta sonda é utilizada em complexos lipídio catiônico/DNA, verifica-se que ocorre uma redução da intensidade de fluorescência, que depende da razão de cargas. Esta redução é causada pela barreira criada pelo lipídio catiônico, diminuindo o acesso da sonda ao DNA (Tsai, 2002). Curvas de intensidade de fluorescência em função da razão de cargas podem ser construídas, permitindo a caracterização quanto ao acesso da sonda nas diferentes estruturas lipídicas.

Uma das dificuldades para medir a intensidade de fluorescência do PicoGreen é a presença de NaCl, que atenua do sinal em até 30%. Os ensaios de

fluorescência poderiam ser comprometidos se o meio reacional utilizado para complexação e medida da intensidade de fluorescência fosse o mesmo empregado para a produção das estruturas lipídicas (salina 0,9% ou 154 mM). A fim de minimizar esta influência, utilizou-se água ultrapura (Milli-Q) como meio reacional de complexação.

Os perfis de intensidade de fluorescência emitida pela sonda PicoGreen nas estruturas do tipo DRV e agregado lipídico em função da razão de cargas (conforme descrito no item 4.5.7), em fluorescência (porcentagem do inicial) estão apresentados na Figura 22.

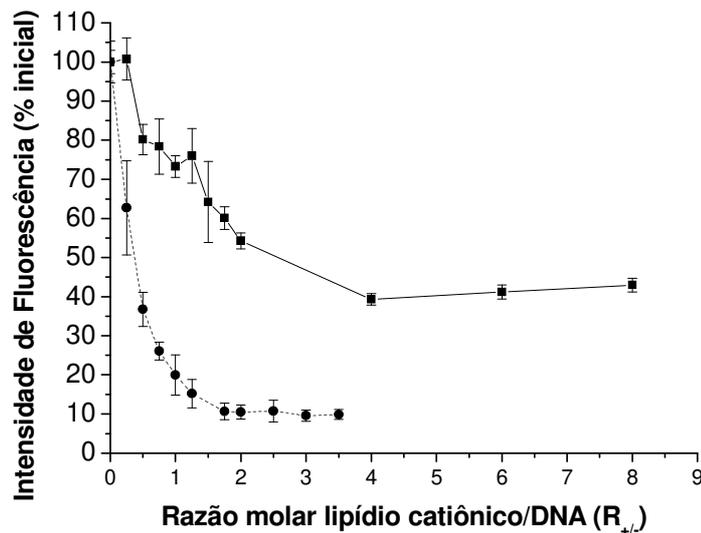


Figura 22: Intensidades de fluorescência (% do inicial – referente ao DNA livre) em função de $R_{+/-}$ nas estruturas DRV-DNA (-■-) (EPC/DOPE/DOTAP, 50:25:25 % molar) e Lipoplexos (-●-) (DOPE/DOTAP, 50:50 % molar) para complexações realizadas em várias razões de carga, em água ultra pura (Milli-Q).

A Figura 22 mostra que a intensidade de fluorescência cai inicialmente e atinge um valor constante a medida que aumenta a razão de cargas. Quando são empregados maiores teores de lipídio catiônico, a quantidade de DNA livre na solução tende a desaparecer e, conseqüentemente, diminui a quantidade de DNA

acessível à sonda. Valores de $R_{+/-}$ maiores que 4 para DRV-DNA e 1,75 para lipoplexo já mantêm a intensidade de fluorescência praticamente constante, indicando que razões de carga maiores não influenciam, possivelmente por não haver mais DNA acessível na suspensão coloidal. Este valor de fluorescência “residual” é então característico de cada tipo de estrutura lipídica, podendo, neste ponto, caracterizar o acesso da sonda ao DNA. Esses valores foram $39,8 \pm 2,0\%$ e $9,8 \pm 1,2\%$, para DRV-DNA e lipoplexo, respectivamente. Isto indica que estruturas DRV-DNA permitem maior acesso do PicoGreen ao DNA. Por outro lado, como a complexação do DNA com o PicoGreen depende fortemente da presença da configuração em dupla fita do DNA, nesses ensaios a intensidade da fluorescência é função não só da quantidade de DNA, mas também da sua conformação (dupla fita ou fita única). Nesse sentido, trabalhos recentes da literatura explicam que interações lipídio catiônico/DNA, que variam com a proporção e natureza do lipídio, podem possivelmente conduzir a uma desnaturação parcial do DNA (Prasad et al., 2003, Nantes et al., 2003, Kikuchi et al. 2000, 1999). Porém, os resultados de eletroforese apresentados na Figura 13, comprovam, embora de maneira qualitativa, a manutenção da estrutura de dupla fita e circular em todas as estruturas lipídicas, o que confirmou o processo de incorporação do DNA nestas estruturas.

Nessa linha de raciocínio, a estruturação coloidal, favorece a manutenção da conformação do DNA em dupla fita e permite que a sonda de fluorescência se ligue mais intensamente ao DNA. No caso dos lipoplexos, que se agregam em bicamada e também na forma hexagonal inversa, o acesso da sonda ao DNA torna-se menor, pois, como já avaliado na transição de fases, estes agregados são menos estruturados, sendo então, mais susceptíveis a mudanças polimórficas, permitindo que ocorra mais facilmente interação em nível molecular entre lipídio catiônico e DNA, dificultando o acesso e suposta intercalação da sonda ao DNA.

Apesar de não se ter realizado medida da fluorescência do lipoplexo e DRV-DNA em $R_{+/-}$ 10, sabe-se que o valor da intensidade de fluorescência é

praticamente igual ao encontrado para $R_{+/-}$ 1,75 e 4, respectivamente, conforme verificado no comportamento da Figura 22 (região do patamar).

A intensidade de fluorescência para o sistema DRV(DNA) em $R_{+/-}$ 10 (formulação utilizada para teste *in vivo*) foi medida, gerando valor de $30,7 \pm 0,04$ %. Este valor é menor que o encontrado para o DRV-DNA (39,8%), possivelmente devido à distribuição mais uniforme existente nos DRV(DNA)s ocasionada pela desidratação e rehidratação. Esta diferença sugere que somente efeitos difusivos estão influenciando a intercalação da sonda ao DNA, indicando que o DRV(DNA) possui DNA mais internalizado em sua estrutura, enquanto o DRV-DNA possui o DNA presente na região mais externa, e que a configuração em dupla fita é mantida. O acesso da sonda ao DNA contido em cada tipo de estrutura pode ser relacionado, organizando-os em ordem decrescente: DRV-DNA > DRV(DNA) > Lipoplexo. Este comportamento permite distinguir as diferenças entre os tipos de estruturas DRVs e agregados lipídicos. Os DRVs permitem maior acesso da sonda ao DNA possivelmente devido à sua maior organização em bicamada, enquanto os agregados lipídicos permitem interação molecular mais intensa, devido à menor estruturação lipídica (presença simultânea das formas lamelar e hexagonal inversa), dificultando difusão e a intercalação da sonda ao DNA.

5.2.6. Morfologias

As morfologias das estruturas lipídicas, obtidas nas condições preparadas para os testes *in vitro* e *in vivo*, foram avaliadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Utilizou-se a técnica que emprega a detecção de imagens do tipo negativa (*negative staining*), sendo esta bastante popular na visualização de particulados através de microscopia eletrônica. Basicamente, a solução lipossomal ou lipídica é colocada em um suporte previamente preparado e mantido durante tempo pré-determinado para permitir que algumas estruturas se depositem no filme, sendo o excesso retirado. Em seguida uma solução de metal pesado é adicionada (neste

caso acetato de uranila), durante tempo também pré-determinado e seu excesso é eliminado. Após a secagem do suporte, os lipossomas acabam sendo envolvidos por uma camada eletrônica amorfa e densa, proveniente da solução de metal pesado, permitindo a aquisição de imagens em microscópio eletrônico de transmissão (New, 1990).

As melhores micrografias obtidas para as estruturas lipídicas são apresentadas nas Figuras 23 a 27.

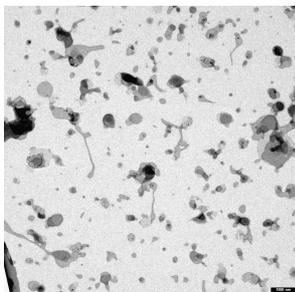
As micrografias de lipossomas do tipo DRV vazio (Figura 23) mostram que sua morfologia é aproximadamente esférica, apresentando certo grau de fusão e agregação, identificada pela presença de estruturas maiores e polidispersas, conforme apresentado na Figura 23A. Algumas agregações vesiculares também podem ser visualizadas na Figura 23B.

O processo de desidratação e rehidratação (DRV) apresenta como principal limitação a produção de lipossomas de elevado diâmetro e de população bastante heterogênea, propiciando também a formação de lipossomas multilamelares (Kirby & Gregoriadis, 1984). A elevada polidispersidade pode ser constatada na distribuição de tamanhos obtidas através de espalhamento da luz (Figura 15-C), onde duas populações são normalmente encontradas: uma menor de diâmetro médio de 175 nm e outra maior com 932 nm. A população com menor diâmetro pode estar relacionada às vesículas que não sofreram agregação ou fusão, enquanto a com maior diâmetro pode relacionar-se às estruturas coloidais maiores provenientes de fusões ou agregações (Figura 23 A e B).

A Figura 24 apresenta micrografias de lipossomas do tipo DRV contendo DNA encapsulado [DRV(DNA)]. Estas estruturas também apresentaram geometria aproximadamente esférica (Figura 24 A), com certo grau de fusão e agregação, gerando algumas mudanças morfológicas (Figuras 24 B, C e D) quando comparadas à mesma estrutura DRV vazia (Figuras 23A e B).

DRV vazio

A)



B)

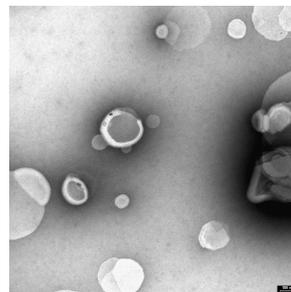


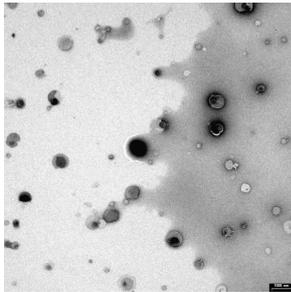
Figura 23: Micrografias de lipossomas do tipo DRV vazios (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 100nm.

Apesar da alteração morfológica causada pela inserção do DNA na estrutura lipossomal que encapsula o DNA - DRV(DNA), a distribuição de tamanhos e o diâmetro médio hidrodinâmico (Figura 15 D e Tabela 6) não se alteram significativamente quando comparada ao lipossoma DRV vazio (Figura 15 C, Tabela 9).

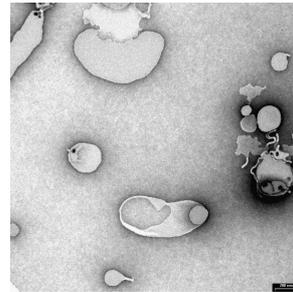
Perrie et al. (2001), utilizaram o mesmo processo de encapsulação de DNA plasmideal em lipossomas catiônicos, compostos por EPC/DOPE e DOTAP em composição lipídica similar à esta pesquisa. Nas micrografias (microscopia eletrônica de crio-fratura), o autor encontrou estruturas lipossomais do tipo multilamelar, aproximadamente esféricas, contendo o DNA provavelmente entre as bicamadas, ligado aos lipídios catiônicos.

DRV(DNA)

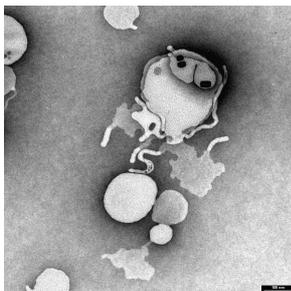
A)



B)



C)



D)

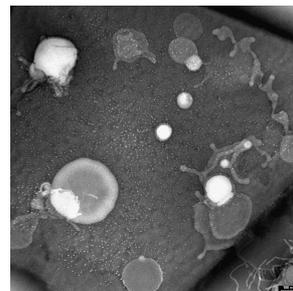


Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas do tipo DRV encapsulando DNA em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 200nm, C) 100 nm, D) 100 nm.

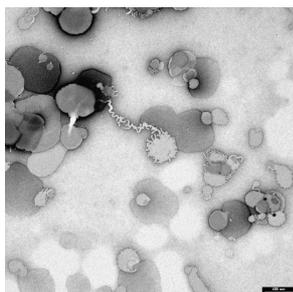
As estruturas DRV(DNA) obtidas nesta pesquisa apresentaram morfologia diferente das encontradas por Perrie et al. (2001), provavelmente devido ao emprego de diferente razão de carga. Perrie et al. (2001) utilizou $R_{+/-}$ 20, enquanto a deste trabalho é $R_{+/-}$ 10 (indicando que a quantidade de DNA utilizada é maior que a empregada por Perrie et al, 2001). A quantidade de DNA encapsulada por Perrie et al. pode ter sido suficiente para não alterar morfologicamente a estrutura, enquanto neste trabalho, o aumento da quantidade de DNA promove alteração morfológica (Figura 23).

Quando uma simples complexação entre lipossomas DRV e DNA ocorre em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10, são identificadas mudanças morfológicas significativas,

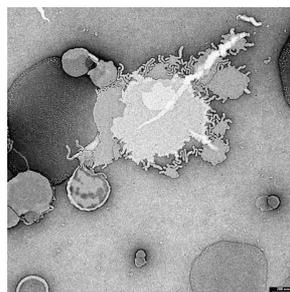
conforme apresentado na Figura 25. Estruturas tubulares podem ser identificadas em regiões próximas da superfície lipossomal, sugerindo que o DNA esteja localizado nas regiões mais externas dos lipossomas (Figuras 25B, C e D).

DRV – DNA

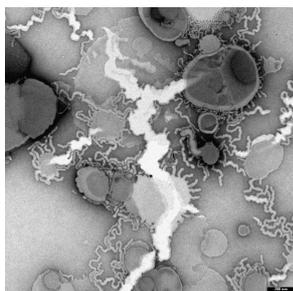
A)



B)



C)



D)

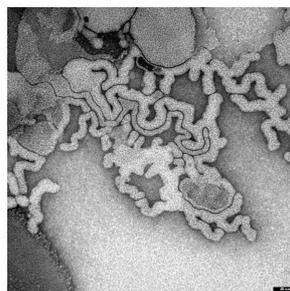


Figura 25: Micrografias de lipossomas do tipo DRV complexados com DNA em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm.

A primeira impressão que se tem quando se observam as micrografias apresentadas nas Figuras 25 B e C é que o feixe de elétrons rompeu o filme e imagens brancas foram geradas.

O rompimento do filme pode ocorrer em três situações: (i) recobrimento da tela de cobre por colódio em espessura bastante fina; (ii) deposição do corante (neste caso acetato de uranila) em quantidades elevadas, causando aumento de espessura. Como este corante interage intensamente com o feixe de elétrons,

pode ocorrer geração de calor, ocasionando o rompimento do filme; (iii) a própria susceptibilidade do material biológico ao feixe de elétrons. Nestes casos, quando ocorre o rompimento do filme de colódio é inerente ao preparo do suporte, ao processo de coramento ou à própria susceptibilidade da amostra.

Uma análise mais criteriosa das Figuras 25, através da ampliação destas imagens mostra que as faixas brancas apresentam uma forma bem delineada que segue um contorno morfológico, dando a impressão que esta parte da estrutura não foi corada adequadamente e que não houve rompimento do filme ou refere-se à susceptibilidade do material. Porém, as imagens brancas que apareceram nestas micrografias não comprometeram a avaliação morfológica das estruturas e, portanto, foram desconsideradas.

Pode-se avaliar a partir da comparação direta entre DRVs vazios (Figura 23) e DRV-DNA (Figura 25) que a complexação entre os lipossomas DRVs e DNA aumenta o tamanho das estruturas. Este aumento pode também ser verificado a partir dos diâmetros hidrodinâmicos médios e distribuição de tamanhos (Tabela 6 e Figura 15 C e E). Esta observação também foi realizada por Wasan et al. (1999). Xu & Szoka, 1996 também reportam que o aumento de tamanho das partículas proveniente do contato entre veículas é bastante complicada e ocorre devido às interações eletrostáticas e possivelmente também por interações hidrofóbicas. Este fato pode ou não envolver fusão completa das membranas lipídicas, que resulte de um rearranjo específico que ocorre após a agregação (contato) e subsequente mistura de lipídios entre vesículas (etapa intermediária) das membranas lipossomais, resultando na formação de uma nova bicamada. Estas interações facilitam a reticulação das vesículas através de pontes de DNA, podendo levar à mudanças nas membranas lipossomais favorecendo fusões ou outras formas de desestabilização das bicamadas (Wasan et al., 1999).

A diferença entre as morfologias encontradas para estruturas do tipo DRV(DNA) e DRV-DNA (Figuras 24 e 25), respectivamente, são significativas, especialmente a superfície externa dos lipossomas. Estruturas do tipo DRV(DNA) apresentam algumas irregularidades morfológicas (Figura 24 C); porém, as estruturas DRV-DNA apresentam elevado grau de irregularidade (Figuras 25 B, C

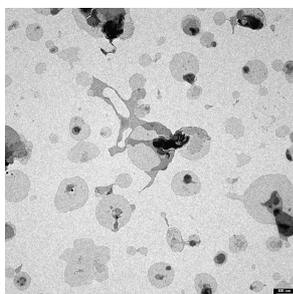
e D), formando estruturas tortuosas em sua superfície. A comparação entre estas duas estruturas sugere que DRV(DNA) apresenta distribuição do DNA mais homogênea ao longo das bicamadas lipídicas, promovida pelo processo de encapsulação (desidratação e rehidratação controlada), enquanto DRV-DNA permite que o DNA localize-se nas superfícies mais externas. A localização mais externa do DNA permite que fusões e agregações entre vesículas ocorram mais facilmente, promovendo rupturas de bicamadas, formando assim as estruturas tubulares ou tortuosas apresentadas na Figura 25 D. Apesar do DNA encontrar-se nas camadas mais externas, ele não está exposto ao seio da solução, mas sim revestido de camadas lipídicas devido ao excesso de cargas positivas, também confirmado pela avaliação da carga superficial das estruturas lipídicas (item 5.2.3).

Esta análise comparativa entre as estruturas do tipo DRV também está consistente com as análises transição de fases (item 5.2.4) e estimativa de área superficial (item 5.2.1) realizadas anteriormente. As análises de DSC para DRV-DNA revelaram que poderia estar ocorrendo um enriquecimento de lipídios catiônicos nas camadas mais externas dos lipossomas enquanto a estimativa de sua área superficial indicou o seu maior valor comparativamente às outras estruturas, promovido basicamente pela presença do DNA na superfície externa. Pode-se, então, a partir das metodologias empregadas para caracterização, presumir que a complexação eletrostática entre lipossomas catiônicos do tipo DRV com DNA e elevada razão de cargas ($R_{+/-}$) (excesso de lipídio catiônico) permite que o DNA esteja presente nas regiões mais externas, sendo ele completamente revestido de lipídios, garantindo uma densidade de cargas positivas na superfície do colóide. Já para a encapsulação, pode-se dizer que a análise da área superficial teve comparativamente o seu menor valor, sugerindo distribuição uniforme do DNA ao longo da estrutura lipossomal. Esta avaliação pode ser confirmada com os termogramas de DSC nos quais não se identifica variação significativa da temperatura de transição de fases principal entre a estrutura vazia e a que encapsula o DNA (item 5.4.2) e também agora com as micrografias.

METs dos agregados lipídicos foram avaliados e estão apresentados na Figura 26. Pode-se identificar a presença de estruturas esféricas (Figura 26A); porém, encontra-se a presença de algumas fusões e agregações. A Figura 26B revela algumas estruturas com irregularidades em sua forma, quando comparado à morfologia de lipossomas do tipo DRV vazio (Figura 23B).

Agregados lipídicos

A)



B)

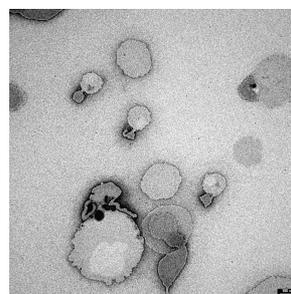


Figura 26: Micrografias dos agregados lipídicos (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). Barras indicam A) 400 nm, B) 100nm.

Wasan et al. (1999) realizou microscopia eletrônica de crio-fratura em estruturas lipídicas de DODAC (cloreto de dioeildimetil amônia/DOPE (50/50% molar) em 150 mM de NaCl e constatou a instabilidade da bicamada, podendo até visualizar que parte da estrutura organiza-se na fase hexagonal inversa. A identificação desta instabilidade pode justificar o polimorfismo encontrado nas estruturas DOPE/DOTAP (50/50% molar) preparadas em 154 mM de NaCl e visualizada através das micrografias (Figura 26A e B).

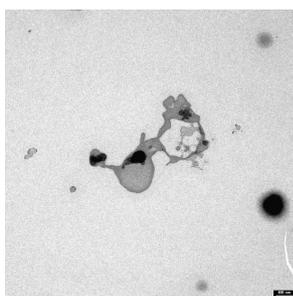
As micrografias de DRVs vazios e agregados lipídicos (Figuras 23 e 26, respectivamente) mostram que ambos os sistemas lipídicos apresentam-se altamente polidispersos. Por outro lado, a análise de distribuição de tamanhos (item 5.2.1) obtidos através de espalhamento dinâmico de luz mostrou que estas estruturas apresentam distribuição bimodal e também bastante polidispersa. A segunda população identificada na distribuição de tamanhos (Figura 15 C e 16A)

pode ser provavelmente conseqüência de algumas fusões que ocorrem, conforme apresentado nas Figuras 23A e 26A, para DRV vazio e agregados lipídicos, respectivamente.

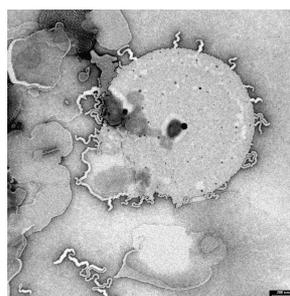
A característica polimórfica dos lipoplexos pode ser facilmente visualizada na Figura 27. Formas aleatórias podem ser obtidas (Figuras 27 B e C); porém, estruturas tubulares igualmente às das estruturas do tipo DRV-DNA (Figura 25 D) também podem ser identificadas (Figura 27 C).

Lipoplexo

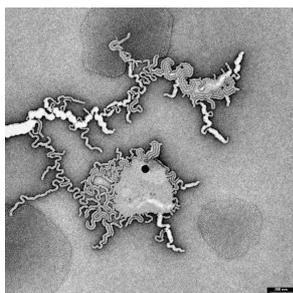
A)



B)



C)



D)

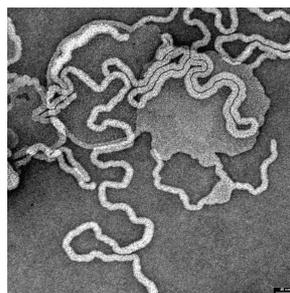


Figura 27: Micrografias dos lipoplexos (agregados lipídicos complexados com DNA em razão de cargas $R_{+/-}$ 10) (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm.

Alterações morfológicas significativas também foram observadas por Wasan et al. (1999) identificando, porém, que a superfície era do tipo “impressão

digital” (“finger print”) para estruturas lipídicas formadas por DODAC/DOPE (50/50 % molar), em razão de cargas 1,6. Estruturas similares também foram encontradas por Gustafsson et al. (1995) e Šmisterová et al. (2001) em sistemas contendo DOPE/DOTAP e SAINT-2 (lipídios catiônicos derivatizados com pirimidina/DOPE 1:1), respectivamente. Interessantemente, a presença destas “impressões digitais” foram encontradas somente em formulações contendo DOPE. Quando DOPE foi substituído por DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) não se encontrou este tipo de morfologia (Wasan et al., 1999), possivelmente pela capacidade deste lipídio de se agregar na fase hexagonal inversa.

De acordo com Wasan et al. (1999), a formação destas estruturas do tipo “impressão digital” ocorre devido a mudanças significativas na morfologia, sendo consequência parcial da agregação causada pelo poliânion (DNA), provocando interações membrana-membrana, causando perturbações, que podem ocasionar a separação de fases dos componentes lipídicos e formação de estruturas que não necessariamente se agregam em bicamada (micelas, fase hexagonal inversa, por exemplo) e consequente fusão. Perkins et al. (1996) encontraram evidências que durante a transição L_{α} para H_{II} , lipídios monoméricos podem ser liberados, permitindo a formação de estruturas não lipossomais polimórficas do tipo folhas membranares (*membrane sheets*), tubular cobertas de DNA (*tubular lipid-coated DNA*) ou complexos como impressões digitais (*fingerprint-like complexes*).

Wasan et al. (1999) propuseram um diagrama esquemático de como as estruturas lipídicas são desestabilizadas pela presença de poliânions para justificar as alterações morfológicas ocasionadas pela complexação (Figura 28). Segundo o autor, a presença de poliânions induz a agregação vesicular (contato próximo) e consequentemente interações membrana-membrana que ocorrem quando as duas membranas entram em contato muito próximo. A perturbação da membrana pode resultar na separação de fases dos componentes lipídicos e formação de estruturas que não se agregam em bicamada. A presença de sais, que alteram a força iônica do meio, também causa modificações morfológicas dramáticas. A presença de DOPE, em soluções contendo sais (por exemplo,

NaCl), permite a formação de estruturas que não se agregam em bicamada. Além disso, a ligação com o poliânion pode causar ruptura da membrana levando à liberação de lipídio monomérico capaz de se ligar ao DNA, levando à formação dos lipoplexos.

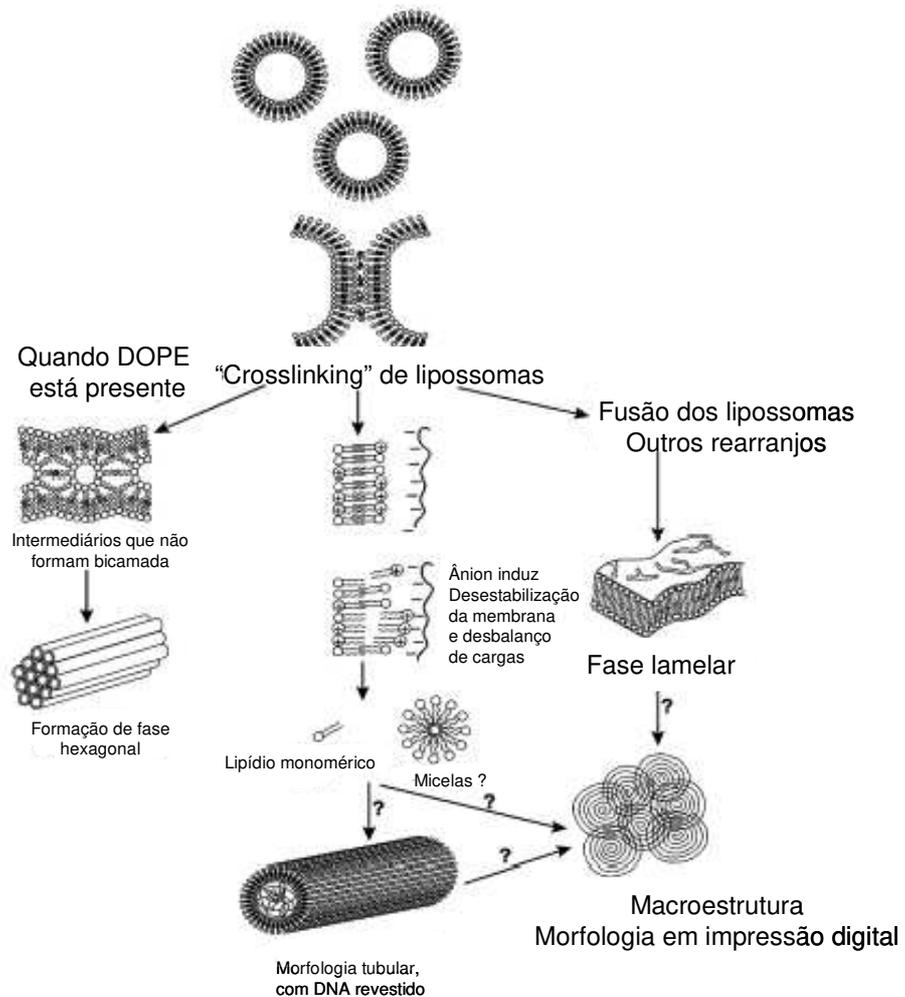


Figura 28: Diagrama esquemático das alterações morfológicas provocadas nas estruturas lipídicas catiônicas quando complexadas com poliânions (adaptado de Wasan et al., 1999)

A avaliação da periodicidade das estrias que formam as estruturas do tipo impressão digital foram determinadas por Wasan et al. (1999) em espaços da ordem de 6,5 nm. Segundo o autor, esta morfologia pode sugerir que o DNA está empacotado na forma de sanduíche.

A avaliação das micrografias para DRV-DNA e lipoplexos (Figuras 25 D e 27 C) permite identificação de regiões que possuem morfologia similar às “impressões digitais” descritas anteriormente. A estimativa das periodicidades encontradas revela valores na faixa de 2,5 a 5,5 nm, de mesma ordem de grandeza que o estudo anteriormente citado, indicando que o mesmo tipo de empacotamento identificado por Wasan et al. (1999) está ocorrendo nas regiões identificadas. Porém, é válido ressaltar que a morfologia global encontrada nos DRV-DNA e lipoplexos não é a mesma encontrada por Wasan et al. (1999), sugerindo que diferenças de parâmetros de processo durante a complexação possam alterar a morfologia dos vários tipos de complexos. Nesta pesquisa, cuidados com a temperatura de complexação (banho de gelo) e forma de agitação, através de vórtice, permitiram uma menor velocidade na cinética de complexação e melhor agitação, ocasionando a alteração morfológica das estruturas quando comparadas com as obtidas por Wasan et al. (1999), sugerindo que a forma de processamento destes complexos influencia diretamente sua morfologia.

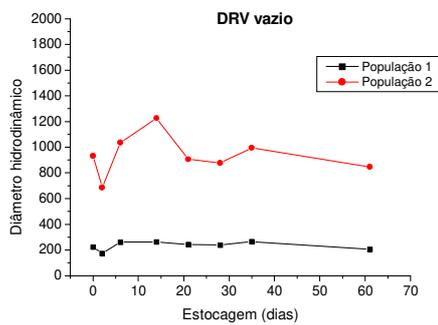
5.2.7. Estabilidade física ao longo da estocagem

A avaliação da estabilidade física das estruturas lipídicas contendo DNA e das respectivas estruturas “vazias” foi realizada monitorando o diâmetro hidrodinâmico das diferentes populações ao longo de 60 dias de estocagem sob refrigeração, conforme apresentado na Figura 29.

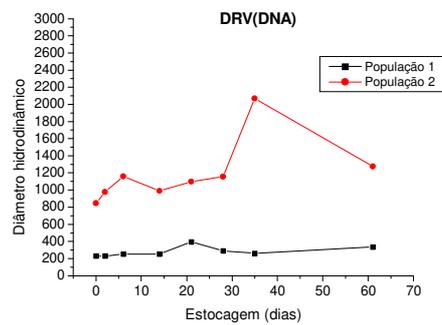
A estrutura do tipo DRV vazio manteve-se praticamente inalterada ao longo de 60 dias de estocagem (Figura 29 A) mantendo as duas populações (200 nm e 900 nm). Quando o DNA é encapsulado [DRV(DNA)], as duas principais populações são mantidas, embora a população de diâmetro hidrodinâmico maior tenha leve tendência a aumentar de tamanho (Figura 29B). Evidencia-se a presença de duas populações com diâmetros hidrodinâmicos da mesma ordem de grandeza que as respectivas populações encontradas para a estrutura vazia,

porém com maior oscilação de tamanho para a população 2. Esta oscilação pode ser justificada pela alteração de morfologia (alteração de esfericidade, por exemplo) encontrada nas micrografias (Figura 23) conferindo certa variação de leitura dos diâmetros no equipamento de espalhamento dinâmico de luz.

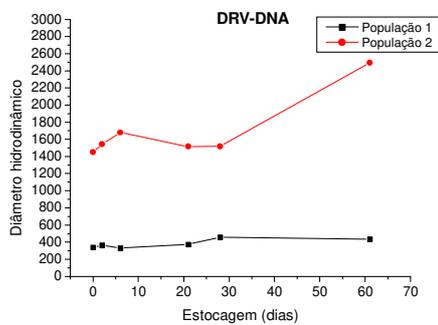
A



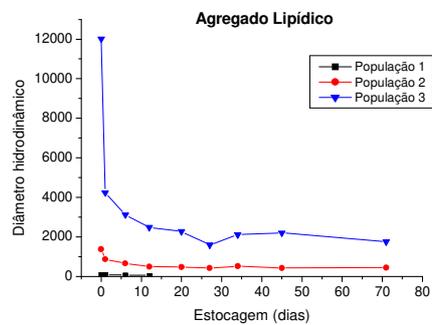
B



C



D



E

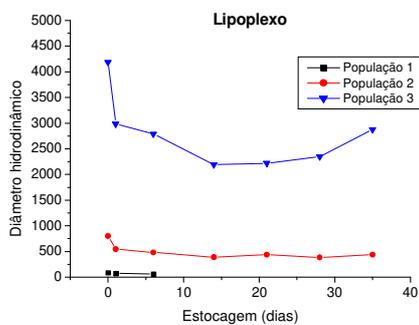


Figura 29: Distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico das estruturas lipídicas ao longo da estocagem sob refrigeração. A) DRV vazio; B) DRV encapsulando DNA [DRV(DNA)]; C) DRV complexando DNA [DRV-DNA]; D) Agregados lipídicos; E) Lipoplexos.

A estrutura DRV-DNA (Figura 29 C), por sua vez, já apresenta maior tendência de agregação da maior população. A população de menor tamanho, com diâmetro médio próximo de 400 nm manteve-se relativamente estável. A população de maior tamanho manteve-se também estável durante 30 dias com certa tendência de agregação após 60 dias de estocagem.

Embora certa variação dos diâmetro hidrodinâmicos ocorram para as estruturas do tipo DRV, a variabilidade foi considerada aceitável, uma vez que o diâmetro hidrodinâmico máximo estabelecido pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose é de 6 μm para a aplicação em vacinas.

A estocagem de agregados lipídicos sob refrigeração e conseqüente acompanhamento da distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico pode ser visualizada na Figura 29 D. Neste caso, pode-se verificar a menor estabilidade destas estruturas, através da presença inicial de três populações, inclusive com agregados da ordem de 12000 nm. Ao longo da estocagem, ocorrem significativas alterações populacionais, pois a partir do 15^o dia de estocagem a menor população com diâmetro inicial de 100 nm desaparece e a terceira população inicia o decaimento de seu tamanho, enquanto a segunda população é a que permanece mais estável, sendo que o sistema apresenta-se altamente polidisperso durante todo o período avaliado.

O comportamento do diâmetro hidrodinâmico das populações dos lipoplexos está apresentado na Figura 29E. Existe uma tendência na variação do diâmetro hidrodinâmico da maior população, indicando que próximo a 15 dias de estocagem esta população assume um tamanho mínimo por volta de 2000 nm para em seguida aumentar novamente. Além disso, após 35 dias de estocagem apareceram agregados que não se dispersavam com uma agitação manual, indicando que um estado irreversível de agregação estava se iniciando.

É interessante notar que todas as estruturas lipídicas catiônicas produziram uma a população com diâmetro na faixa de 200 a 500 nm que se mantém

relativamente estável ao longo do período de estocagem avaliado, independentemente da composição (presença ou ausência do lipídio estrutural) e método de incorporação do DNA (encapsulação ou complexação eletrostática).

5.2.8. Considerações sobre a preparação dos DRVs

Aspectos de processo foram levados em consideração visando a simplificação das etapas operacionais. Os resultados da avaliação da etapa de extrusão são apresentados no item 5.2.8.1, enquanto os resultados da estocagem dos lipossomas na forma liofilizada por períodos prolongados está no item 5.2.8.2.

5.2.8.1. Avaliação da etapa de extrusão

A produção das vesículas DRVs possui uma etapa na qual os lipossomas hidratados (obtidos imediatamente após a hidratação do filme lipídico seco) são submetidos à extrusão em membrana de policarbonato de diâmetro médio nominal de 100 nm, para redução e homogeneização de tamanhos. Esses lipossomas extrudados são então liofilizados para que os DRVs sejam formados após a rehidratação em condições controladas.

A fim de investigar a influência da etapa de extrusão na distribuição de tamanhos e no diâmetro médio hidrodinâmico, obteve-se DRVs a partir de lipossomas que sofreram ou não a extrusão. Os DRVs obtidos com a extrusão apresentaram pelo menos duas populações com diâmetro médio hidrodinâmico de 257 e 915 nm, enquanto nos reconstituídos a partir de lipossomas sem extrusão foram 279 e 969 nm. A distribuição de tamanhos pode ser visualizada nas Figuras 30 A e B para duas amostras independentes. Na Figura 30C, é apresentada a variabilidade nas medidas obtidas para uma mesma amostra, exemplificada com uma das amostras de DRV reidratado, obtido a partir de lipossomas extrudados.

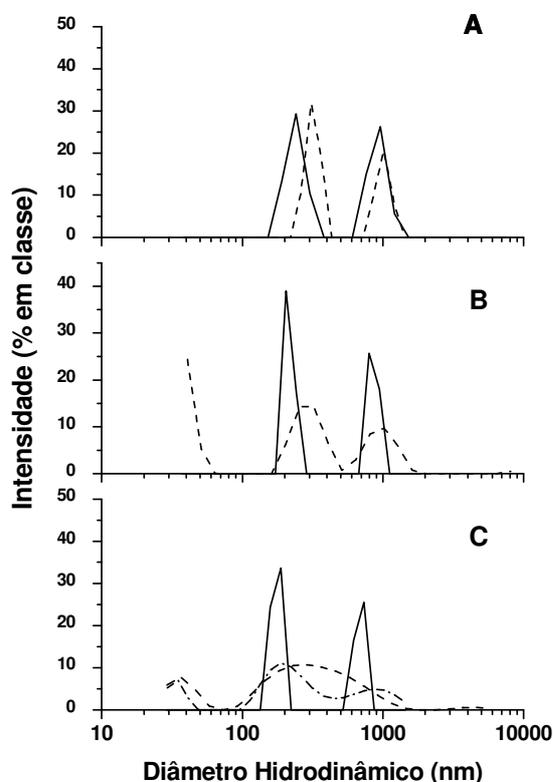


Figura 30: Distribuição de tamanhos dos lipossomas catiônicos do tipo DRV, contendo EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25 % molar em solução salina 0,9%) obtidos a partir de A) lipossomas que não sofreram extrusão e B) Lipossomas que foram previamente extrudados e C) Três medidas obtidas para uma mesma amostra. As curvas dos gráficos A e B referem-se a duas amostras independentes.

Os resultados obtidos mostram que não há variações expressivas na faixa de diâmetro médio das populações em ambas as condições. Portanto, pode-se concluir que a etapa de extrusão não é necessária para obtenção destes DRVs, e pode ser excluída do processo.

A Figura 30 C ilustra a variabilidade das repetições das medidas, confirmando o que já foi visto anteriormente em microscopias realizadas neste trabalho, as quais mostram que essas estruturas não são perfeitamente esféricas. Estudo mais aprofundado nesse aspecto poderia ser feito com medidas de espalhamento de luz a diferentes ângulos de espalhamento.

O comportamento destes dados pode ser explicado pelo próprio princípio da formação de DRVs, estabelecido por Kirby & Gregoriadis, 1984, no qual o processo de desidratação e rehidratação controlada, induz à fusão dos lipossomas. Perrie & Gregoriadis (2000) identificaram que o diâmetro médio final pode ser modulado pelo teor de lipídio catiônico: teores elevados, formam lipossomas de diâmetros menores devido à maior repulsão das cargas catiônicas provenientes do lipídio DOTAP. Adicionalmente, os resultados aqui obtidos mostram que o tamanho inicial das partículas não interfere no tamanho final dos lipossomas re-hidratados. Portanto, a fusão é controlada pela densidade de cargas dos lipídios na formulação.

Nestas condições a extrusão será excluída do processo de obtenção dos DRVs, proporcionando uma redução de custo e simplificando, do ponto de vista prático e operacional, as etapas de trabalho.

5.2.8.2. Estocagem dos lipossomas liofilizados

Uma das etapas intermediárias na obtenção dos lipossomas do tipo DRV é a liofilização. A fim de se avaliar o comportamento dos DRVs após um período prolongado de estocagem sob a forma liofilizada, três amostras independentes de lipossomas catiônicos foram estocadas sob vácuo relativo (650 mmHg) (em dessecador) e refrigeração (8°C). A manutenção do vácuo durante essa estocagem é bastante crítica, uma vez que o lipídio EPC é altamente higroscópico. Sabe-se que estruturas secas amorfas são susceptíveis à desestabilização durante a estocagem. Ao final de um ano, estas mesmas amostras foram rehidratadas e o diâmetro médio hidrodinâmico das populações foi 261 ± 84 e 862 ± 185 nm. A distribuição de tamanhos é apresentada na Figura 31.

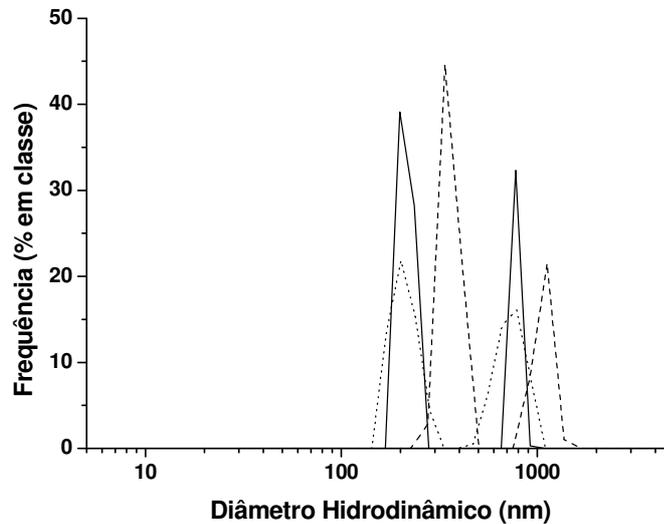


Figura 31: Distribuição de tamanhos dos lipossomas catiônicos do tipo DRV contendo EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25 % molar) rehidratados após um ano de estocagem sob vácuo relativo de 650 mmHg e refrigeração (8°C). Cada distribuição representa uma amostra de lipossoma independente (n=3).

Nestas condições a distribuição de tamanhos e os diâmetros médios populacionais são semelhantes à dos lipossomas do tipo DRV não estocados (valores típicos, foram apresentados na Figura 15 C e Tabela 6). Conclui-se, portanto, que a estocagem na forma liofilizada pode ser realizada por períodos prolongados de até 1 ano (período avaliado). Essa estocagem pode favorecer o processo do ponto de vista operacional, uma vez que estoques de intermediários podem ser mantidos e as rehidratações realizadas conforme a demanda desta vacina.

5.3. Escolha da estrutura lipossomal mais promissora

As estruturas lipídicas preparadas (item 4.4) e caracterizadas através dos parâmetros físico-químicos, conforme descrito nos itens 5.1 e 5.2, foram enviadas para o Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT-RP), onde ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados para a escolha da estrutura lipossomal mais promissora, do ponto de vista do efeito profilático (Rosada, 2006).

Estes resultados estão apresentados detalhadamente na dissertação de mestrado de Rogério Silva Rosada, sob orientação da Profa. Dr. Arlete A. M. Coelho Castelo e co-orientação do Prof. Dr. Célio Lopes Silva (resumo e conclusões apresentados na íntegra nos Anexos VI e V, respectivamente), onde vários aspectos foram avaliados: (i) Detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* por RT-PCR, (ii) Citotoxicidade *in vitro*, (iii) Avaliação do efeito profilático para as rotas intramuscular e intranasal, em diferentes dosagens.

Nos itens 5.3.1 a 5.3.3, são apresentados os principais resultados obtidos e discussão contida no referido trabalho, à qual se adicionou observações complementares que associam as propriedades físico-químicas das estrutura à sua função biológica.

5.3.1. Detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* por RT-PCR

Através da transfecção *in vitro* em macrófagos da linhagem J774 foi possível identificar se o plasmídeo conseguiu atingir o núcleo celular e realizou a etapa de transcrição para que a síntese do RNA mensageiro (mRNA) que contém a codificação da proteína hsp 65 possa ocorrer.

O método empregado, descrito no ANEXO VI, consistiu em realizar a incubação das estruturas lipídicas com as células de macrófagos, para em seguida realizar a extração do RNA total. Como é difícil a identificação do mRNA específico do hsp 65, utiliza-se uma enzima do tipo transcriptase reversa para a

obtenção do cDNA (DNA complementar) total. Através da técnica de PCR, realizou-se a amplificação do cDNA específico para o hsp 65 ou β -actina (controle) para posterior identificação em eletroforese em gel de agarose. Como a β -actina é um elemento constitutivo das células eucarióticas, ela foi utilizada como controle do processo.

As diversas construções lipídicas contendo o plasmídeo pVAXhsp 65 ou apenas o vetor pVAX, além do plasmídeo e vetor nu, foram avaliadas quanto à mensagem para hsp 65. O controle para a β -actina foi positivo para todas as construções (Figura 32), indicando a obtenção do mRNA é possível. A presença de mRNA para hsp65 foi identificada apenas nas células que foram transfectadas com a estrutura DRV-DNA hsp65, sugerindo que essa construção apresenta eficácia maior de transfecção *in vitro*, quando comparada com as demais formulações utilizadas. A não detecção de mensagem para a hsp65 com as demais formulações pode ser decorrente da baixa eficiência de transfecção, o que pode ser compensada por período de tempo maior de cultura *in vitro* para a detecção da mensagem para a hsp65. Através da caracterização dos DRV(DNA)s pode-se observar que estas estruturas são mais compactas, apresentando diâmetro médio populacional e área superficial por unidade de massa menor. Esta característica pode ter influenciado durante o processo de transfecção, necessitando-se possivelmente de tempo maior de incubação com os macrófagos para que esta estrutura permita que o DNA incorporado nas regiões mais internas seja liberado.

Nesse ensaio também não foi observada a positividade para o complexo formado com lipofectina e DNA, nas condições recomendadas pelo fabricante. Uma das razões atribuídas a esse evento foi a presença de considerável quantidade de lise celular durante a transfecção com a formulação de lipofectina e DNA, o que pode ter concorrido para a degradação de RNAs mensageiros. Embora seja possível obter mensagem para β -actina dessas amostras, indicando que pelo menos parte do mRNA estava em boa qualidade, mensagens em menor

frequência, como a da hsp65, podem ter sua detecção prejudicada nessa situação.

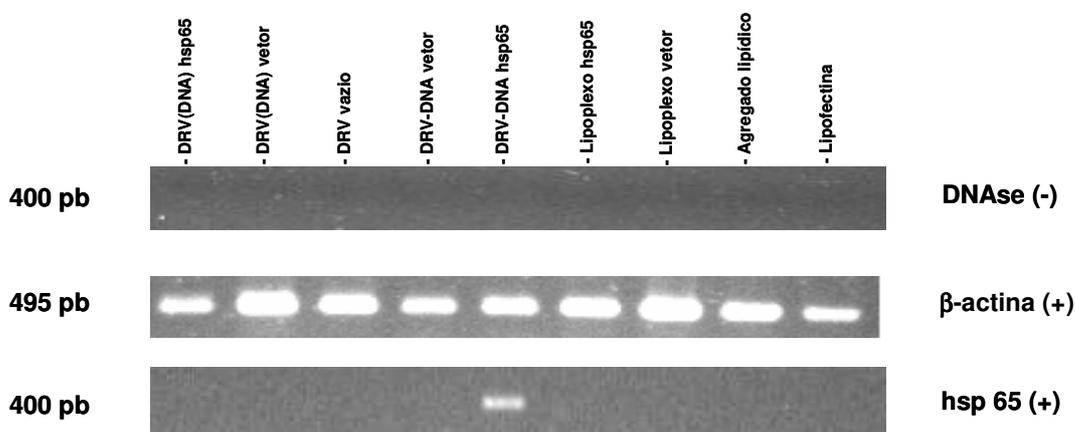


Figura 32: Detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* utilizando o RT-PCR. Macrófagos da linhagem J774 foram transfectados com as diferentes formulações lipossomais durante 72 horas e extraído o seu RNA total. A presença de mensagem nessas células foi detectada por RT-PCR utilizando os *primers* específicos para hsp65. A qualidade do cDNA utilizado foi checada pela ampliação da β -actina. A amplificação das amostras tratadas com DNase I está identificada por DNase (-), o que indica se ainda há ou não DNA nessas amostras tratadas. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1 %) e as bandas visualizadas por coloração com brometo de etídio. pb: pares de bases (Fonte: Rosada, 2006).

Curiosamente, da mesma forma que a lipofectina, também se verificou grande presença de lise celular durante a transfecção para os macrófagos transfectados com agregados lipídicos e lipoplexos.

A detecção da mensagem para hsp65 por RT-PCR, pelo menos para a estrutura DRV-DNA, é outro indicativo que confirma a integridade do plasmídeo (já verificada no item 5.1), indicando que o processo de expressão gênica estava se completando, pois o DNA atingiu o núcleo celular dos macrófagos e possibilitou produção do mRNA.

5.3.2. Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade foi realizada devido ao conhecimento prévio da citotoxicidade conferida aos lipídios catiônicos. Além disso, ajuste das formulações lipídicas realizado para garantir a dosagem de 50 µg de DNA em 100 µL de formulação lipídica aumentou as concentrações lipídicas e conseqüentemente do lipídio catiônico. A elevação do teor deste lipídio (DOTAP) fez-se necessária, uma vez que o elevado grau de incorporação do DNA deve-se à presença deste lipídio de característica catiônica que garante a complexação eletrostática.

Neste contexto, as diferentes construções lipídicas foram avaliadas quanto à citotoxicidade *in vitro* em células de macrófagos da linhagem J774 através do emprego de metodologia baseada na redução do brometo de tiazolil - (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - Sal de tetrazólio MTT, realizado apenas pelas células vivas (Denizot & Lang, 1986, método descrito no ANEXO VI).

A Figura 33 apresenta as curvas de células viáveis relativas ao controle para as várias estruturas lipídicas [DRV vazio, DRV-DNA, DRV(DNA), agregado lipídico e lipoplexo] em presença do plasmídeo pVAX-hsp 65 em várias concentrações. A abscissa deste gráfico possui 2 escalas diretamente relacionadas: a quantidade de DNA utilizada para os ensaios *in vitro*, proporcional à quantidade de lipídio catiônico (DOTAP) da solução lipídica empregada. Estas escalas duplas são necessárias, pois a avaliação teve âmbito geral, incluindo o DNA nu (em quantidade proporcional ao utilizado nas formulações lipídicas) e formulações lipídicas contendo DNA ou não.

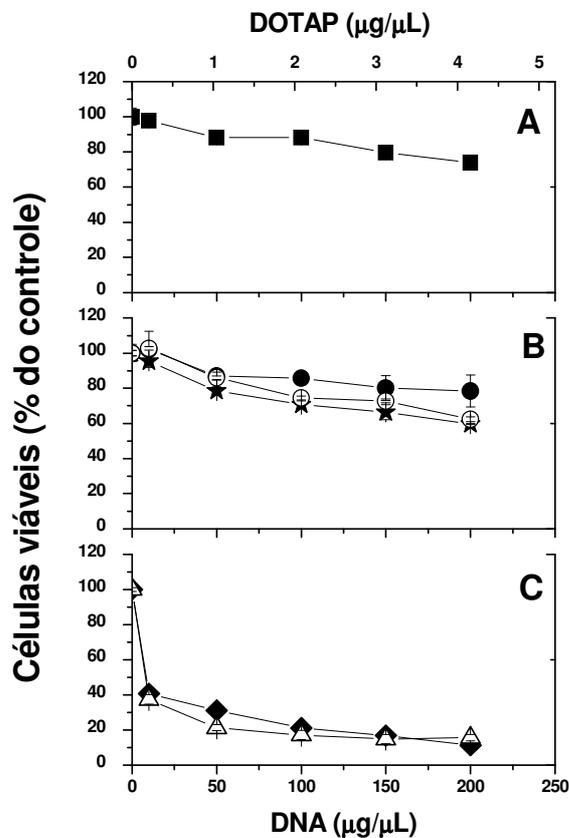


Figura 33: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em macrófagos J774 através do emprego de metodologia baseada na redução do brometo de tiazolil - (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - sal de tetrazólio MTT para as diferentes construções lipídicas vazias, contendo o plasmídeo pVAX-hsp 65 ou contendo somente o vetor comercial pVAX. Os gráficos representam os seguintes grupos: A) DNA nu; B) Grupo dos DRVs, onde (-●-) DRV-DNA, (-★-) DRV(DNA), (-○-) DRV vazio; C) Grupo dos lipoplexos, onde (-◇-) Agregado lipídico e (-△-) lipoplexos. (Fonte: Rosada 2006).

Pode-se destacar (Figura 33), que para estruturas do tipo DRV ou apenas o DNA nu com dosagens de até 200 µg de DNA ou 4 µg de solução lipídica, 70% das células ainda permanecem viáveis, enquanto agregados lipídicos e lipoplexos apresentam menos que 50% das células viáveis para dosagem de 8,37 µg de DNA ou 0,16 µg de DOTAP. Este comportamento indica elevada citotoxicidade

destas estruturas lipídicas que não contém a fosfatidilcolina natural de ovo em sua formulação.

A primeira hipótese a se considerar é que a toxicidade poderia estar relacionada à intensidade da densidade de carga coloidal, uma vez que coincidentemente, as estruturas que apresentaram maior citotoxicidade apresentaram maiores valores de potencial zeta (item 5.2.3). Isto poderia de alguma forma estar relacionado à exposição de cargas positivas do colóide. Porém, Filion & Philips (1997) estudaram sistematicamente a toxicidade e atividade imunomoduladora de várias formulações lipídicas destinadas à liberação de DNA no interior de células. Neste estudo, os autores constataram que lipídios catiônicos como DDAB (brometo de dimetildiocetadecil amônio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano), DMTAP (dimiristoil- trimetilamônio-propano) são tóxicos para células de macrófagos. DOPE, quando avaliado individualmente não apresenta toxicidade; porém, quando associado aos lipídios catiônicos, exerce toxicidade a macrófagos maior quando comparada à lipídios catiônicos isoladamente. Quando DPPE-PEG 2000 (dipalmitoilphosphatidilethanolamina-poliétileno glycol 2000), que conhecidamente impede a fagocitose ocorra, foi associado ao agregado lipídico DOPE/DOTAP a toxicidade foi eliminada. Quando os autores substituíram o DOPE por DPPC, a toxicidade foi reduzida a níveis similares aos lipossomas aniônicos ou neutros (“zwitteriônicos”). As medidas de potencial zeta realizadas pelos autores nas várias formulações não correlacionam com a citotoxicidade, de modo que a densidade de cargas não é um parâmetro no qual possa haver predição a respeito da toxicidade em macrófagos.

Curiosamente, a Figura 33 identifica que a inclusão do lipídio zwitteriônico EPC aos lipídios DOTAP, DOPE reduz a toxicidade a níveis similares ao do DNA nu. Outro fator bastante interessante é que as formulações utilizadas para lipoplexos e DRVs apresentam a mesma quantidade mássica de lipídio catiônico e a toxicidade é alterada radicalmente, apenas acrescentando-se o lipídio zwitteriônico EPC. Isto indica, mais uma vez, que as estruturas são organizadas diferentemente, produzindo diferentes toxicidades.

Levando em conta esta avaliação da citotoxicidade, as estruturas do tipo agregadas lipídico e lipoplexo não serão investigadas em termos de resposta imunológica, uma vez que esta estrutura apresenta-se tóxica. É válido ressaltar que muitos ensaios de transfecção *in vitro* são realizados com estas estruturas; porém, as concentrações lipídicas são bastante inferiores à proposta neste trabalho.

5.3.3. Avaliação do efeito profilático das estruturas lipídicas

Rosada, 2006 avaliou o efeito profilático da construção plasmideal pVAX-Hsp65 (carreadora do gene Hsp65 de *M. leprae*), nu ou veiculado nas construções lipídicas desenvolvidas nesta pesquisa [DRV(DNA) e DRV-DNA] para as rotas intramuscular e intranasal. A estratégia usada contemplou a influência conjunta da via de administração e dose aplicada, resumida na Tabela 11.

Tabela 11: Estratégia para avaliação do desempenho da vacina gênica em ensaios *in vivo*.

Via de Administração		Dose (μg)
Intramuscular	DNA nu	300 (3 aplicações de 100 μg)
	DRV-DNA e DRV(DNA)	50 (dose única) ou 100 (2 aplicações de 50 μg)
Intranasal	DRV-DNA e DRV(DNA)	25 (dose única)

Dos resultados das várias caracterizações dos efeitos *in vivo* da vacina, pode-se ressaltar os seguintes aspectos principais relacionados com as estruturas lipossomais. Na análise desses aspectos, a proteção foi definida como o abaixamento igual ou superior a 0,5 log do número de unidades formadoras de colônias (CFU) nos pulmões dos animais desafiados com *M. tuberculosis*, mantendo a integridade do parênquima pulmonar.

Para via intramuscular:

- As estruturas lipossomais [DRV-DNA e DRV(DNA)] que continham o gene para Hsp65 modificaram os padrões de resposta em termos de anticorpos e citocinas, em relação ao DNA nu Hsp65, onde um exemplo típico é a produção da citocina do tipo interferon γ (INF γ), apresentado na Figura 34. Apesar deste comportamento, não houve diferenciação na proteção conferida pelas estruturas lipossomais para animais imunizados com as vacinas em apenas uma dose, como se pode verificar na Figura 35.
- A administração de somente uma dose de 50 μ g não conferiu proteção (Figura 35); porém, para 2 doses de 50 μ g houve redução (0,57 log) na unidade formadora de colônia (CFU) de amostras pulmonares (Figura 36), mostrando, um claro efeito protetor. Porém, também não houve diferenciação clara entre as estruturas. Conclusões semelhantes foram tiradas com relação às análises da arquitetura do parênquima pulmonar.

Para a via intranasal

- A administração intranasal, com a menor dosagem de DNA para as formulações lipossomais (25 μ g em dose única), apresentou uma proteção muito superior a todas as outras estratégias anteriores. Este fenômeno pode ser evidenciado pela redução de 1,02 log na CFU obtida do pulmão (Figura 37) e pela manutenção da arquitetura pulmonar. Na comparação das várias estratégias de imunização (Figura 38), a estrutura DRV-DNA exibiu os melhores resultados.

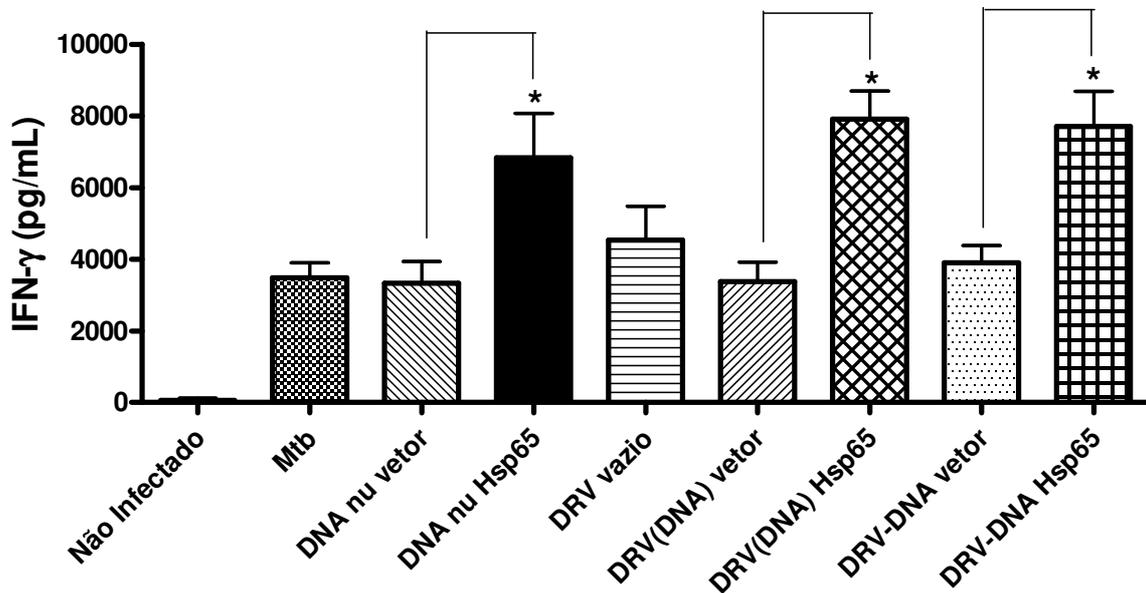


Figura 34: Produção de IFN- γ por células do pulmão de animais vacinados com DNA Hsp65 nu e diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 3 doses de 100 μ g de DNA nu Hsp65 ou com uma única dose de 50 μ g de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da imunização, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para determinação da produção de citocinas por ELISA. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão de cada grupo. Este experimento é representativo de 2 outros com resultados similares. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos vetores e ao grupo Mtb (Fonte: Rosada, 2006).

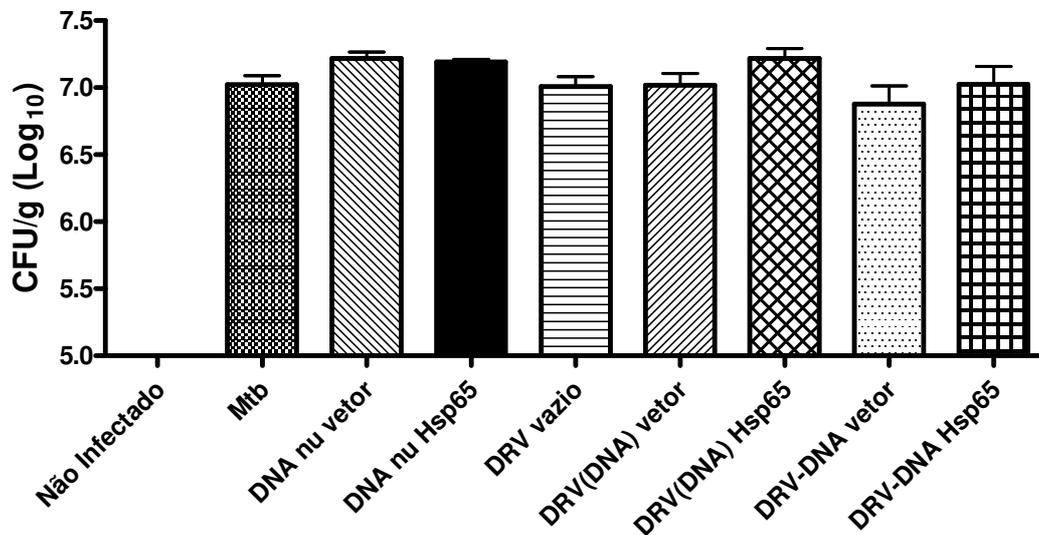


Figura 35: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com DNA Hsp65 nu ou diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 3 doses de 100 µg de DNA nu Hsp65 ou com uma única dose de 50 µg de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados são representados em log₁₀ ± desvio padrão do CFU/g de cada grupo. Este experimento é representativo de 2 outros com resultados similares (Fonte: Rosada, 2006).

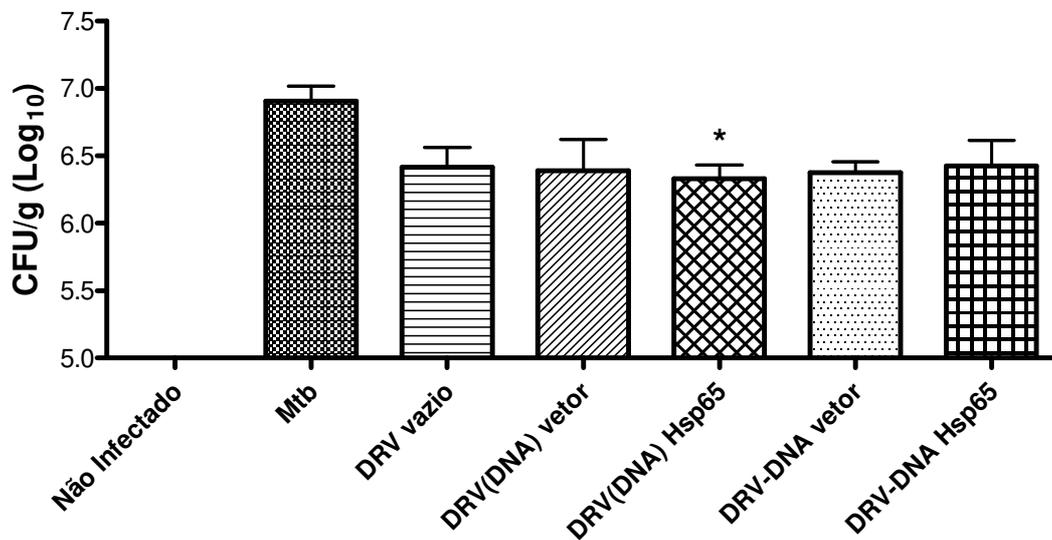


Figura 36: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular com 2 doses de 50 µg de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas a intervalos quinzenais. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo *Mtb* foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônias. Os resultados são representados em log₁₀ ± desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao Mtb (Fonte: Rosada, 2006).

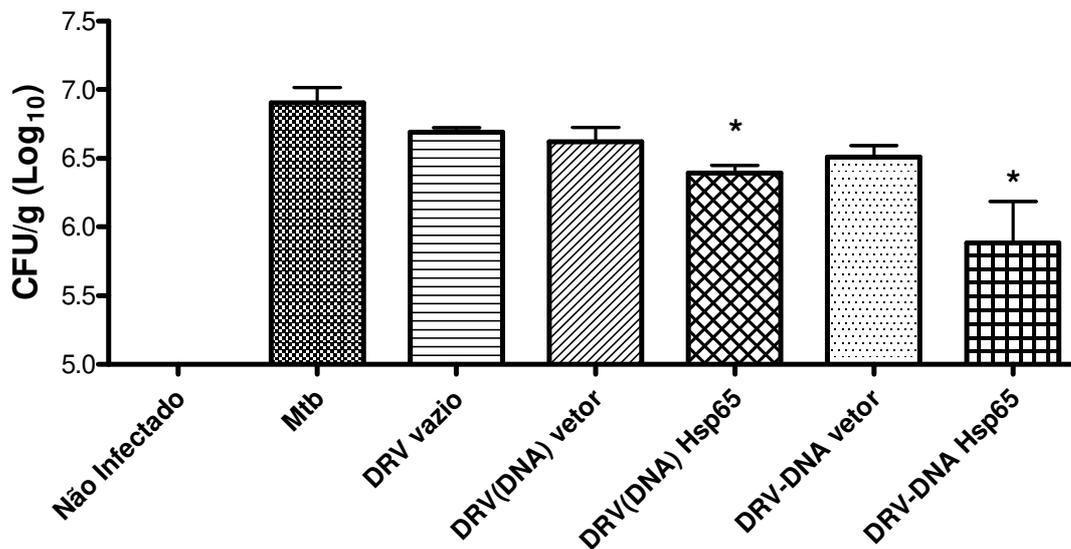


Figura 37: Recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes construções lipossomais e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados por instilação intranasal com uma dose de 25 µg de DNA Hsp65 veiculado em lipossomas. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Os camundongos do grupo *Não Infectado* receberam PBS estéril nos dias de imunização e desafio, já os do grupo Mtb foram desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e seus pulmões extraídos para recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados são representados em log₁₀ ± desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao Mtb (Fonte: Rosada,2006).

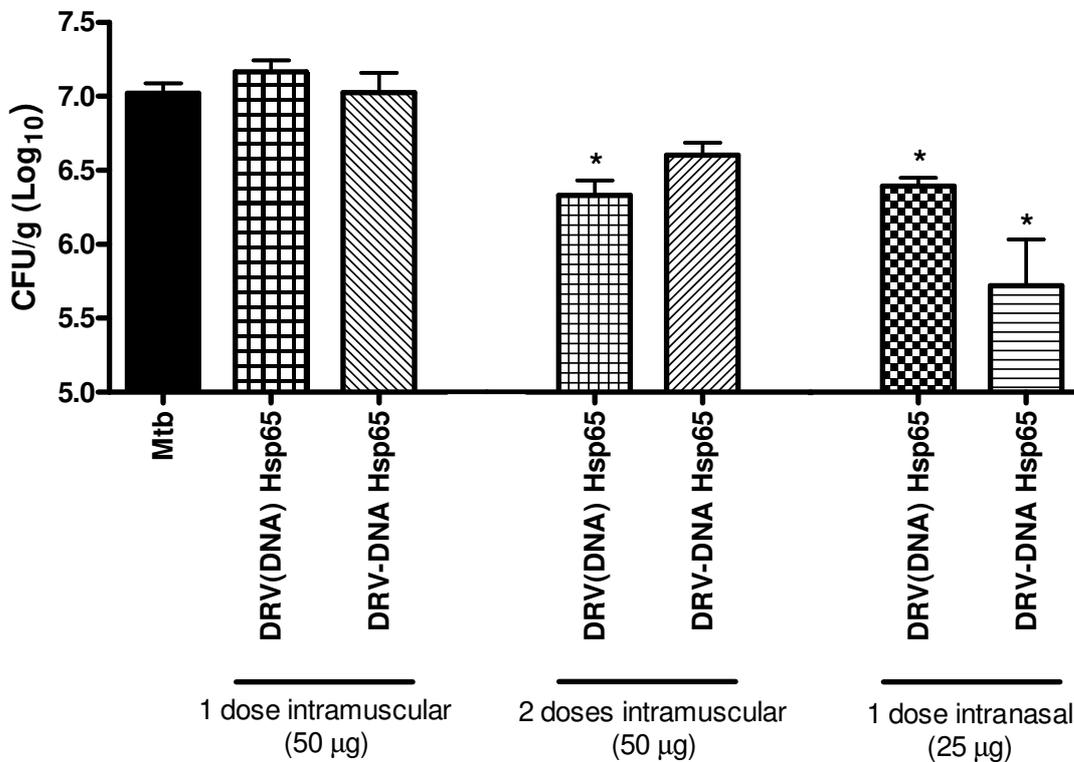


Figura 38: Comparação entre a recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes doses, construções e rotas e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados com uma dose de 50 µg de DNA Hsp65 ou 2 doses de 50 µg de DNA Hsp65 por via intramuscular, ou com uma dose de 25 µg de DNA Hsp65 por instilação intranasal. Grupos controle foram administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10⁵ bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados são representados em log₁₀ ± desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A diferença estatística foi considerada significativa quando *p<0,05 em relação ao Mtb (Fonte: Rosada, 2006).

Esses resultados apontam nitidamente o caminho para se conseguir o grande desafio que é uma vacina gênica de dose única para a tuberculose. Além disso, a veiculação do DNA na estrutura lipossomal DRV-DNA, tem a vantagem

adicional de ser mais efetiva pela via intranasal, que é uma via não invasiva, desejável para a administração de fármacos.

Neste contexto, a rota de administração e a estrutura lipossomal para trabalhos de pesquisa futuros foram estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa (Ribeirão Preto e Campinas) como a via intranasal e DRV-DNA. Assim, os trabalhos subsequentes de inclusão do peptídeo com sinal direcionador para núcleo celular foram restritos à essa estrutura lipossomal.

5.4. Inclusão de peptídeo com sinal direcionador para o núcleo na formulação DRV-DNA

A veiculação de DNA em sistemas contendo lipossomas catiônicos é bastante eficiente na etapa de internalização do DNA no interior do citoplasma (Tseng et al., 1997; Felgner et al., 1987). Uma vez liberado no citosol, se o DNA for protegido com histonas das DNAses presentes neste compartimento celular, a eficiência de transfecção pode elevar-se (Subramanian & Diamond, 1997; Fritz et al., 1996); porém, a membrana nuclear ainda é uma etapa limitante para a transfecção (Banks et al., 2003).

Para superar a barreira presente no envelope nuclear, pode-se incluir nas mesmas formulações peptídeos que possuem característica de sinalizador para transporte ativo através desta membrana, denominados de “Nuclear Localization Signal” (NLS). Essa combinação tem mostrado aumento na eficiência de transfecção (Subramanian et al., 1999, Byrnes et al., 2002; Tagawa et al., 2002). Dessa forma, vários peptídeos sintéticos têm sido projetados, baseados em seqüências de aminoácidos que iniciam o transporte através envelope nuclear.

Neste trabalho, um peptídeo sintético (NLS) de 21 aminoácidos foi projetado, contendo as seguintes seqüências:

- (i) Direcionamento nuclear: seqüência de direcionamento do SV 40 T (Simian virus) já bastante conhecida (contendo 7 aminoácidos: PKKKRKV, Kalderon, 1984) ;
- (ii) Veiculador: seqüência com 13 resíduos de aminoácidos de característica catiônica (KCRGKVPGKYGKG), também derivado do SV 40T. Sua função é elevar a capacidade de interação eletrostática com o DNA (Subramanian et al., 1999 e Byrnes et al., 2002);
- (iii) Resíduo de cisteína no terminal carboxílico: A presença de um terminal cistamida que esteja amidado foi considerada, pois elevam a eficiência de transfecção, provavelmente por estabilizar a partícula DNA-peptídeo (Simeoni et al., 2003 e McKenzie et al., 2000).

Devido à presença de duas cisteínas na seqüência total, o peptídeo sofreu ciclização para evitar que pontes de enxofre pudessem ser formadas aleatoriamente e fora de controle durante a complexação com o DNA.

5.4.1. Caracterização do sistema binário DNA-peptídeo

A obtenção do sistema ternário lipossoma-DNA-peptídeo requer uma complexação prévia entre DNA e peptídeo. Os itens a seguir apresentam as caracterizações do complexo binário em termos de razão molar para incorporação completa do DNA ao peptídeo (item 5.4.1.1) e do diâmetro médio e distribuição de tamanhos (item 5.4.1.2).

5.4.1.1. Determinação da proporção DNA-peptídeo para completa incorporação

Sabendo que a agregação entre o DNA e o peptídeo projetado para este trabalho é de natureza catiônica, a determinação da proporção DNA-peptídeo na qual todo o ácido nucleico encontra-se complexado é interessante para a

caracterização físico-química do complexo e foi determinada (item 4.5.2.2). Essa proporção foi determinada através de eletroforese em gel de agarose. O princípio da metodologia é o mesmo realizado para a avaliação da razão entre cargas (+/-) entre DNA e lipossoma catiônico, no qual o DNA livre migra no gel de agarose e o DNA complexado com o peptídeo, não se desloca devido ao tamanho do agregado.

A Figura 39 apresenta a fotografia do gel de agarose para várias proporções molares, onde é possível identificar que a razão molar 0,5 entre as cargas positivas do peptídeo e as negativas do DNA já promove toda a complexação do DNA.

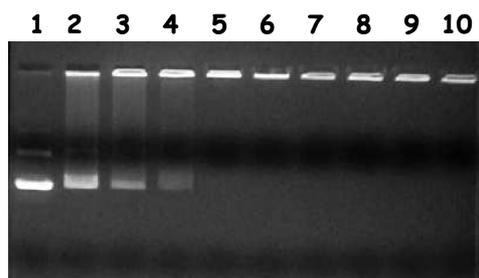


Figura 39: Fotografia do gel de agarose 0,75% para o complexo DNA-peptídeo (com seqüência de aminoácidos com sinal direcionador para núcleo celular) em solução salina 0,9% a várias proporções molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA. As linhas representam: 1) DNA (pVAXhsp65); Razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} : 2) 0,2; 3) 0,3; 4) 0,4; 5) 0,5; 6) 0,6; 7) 0,7; 8) 0,8; 9) 0,9; 10) 1,0.

Assim, para garantir que todo o DNA esteja complexado e também um pequeno excesso de peptídeo, escolheu-se a razão molar 1 para as complexações subsequentes envolvendo lipossomas catiônicos.

A razão de elevar a quantidade de peptídeo na formulação foi baseada na determinação da quantidade necessária para neutralizar todo do DNA e também a partir de 3 estudos envolvendo peptídeos catiônicos, lipossomas catiônicos e DNA para elevar a eficiência de transfecção em ensaios *in vitro*, dos quais é interessante citar:

No primeiro estudo, Byrnes et al., 2002 complexou o peptídeo M9-ScT (com direcionamento nuclear) em várias razões mássicas, para a mesma quantidade de DNA e lipofectamina. Pode-se constatar que elevando a razão mássica M9-ScT:plasmídeo, aumenta o número de células transfectadas. A transformação das razões mássicas para razões molares de cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA estão entre 10 e 100. Subramanian et al., 1999, realizaram estudo semelhante, também com peptídeo de direcionamento nuclear, na qual a razão molar ótima foi de 50. Em contrapartida, Gao & Huang, 1996, estudaram o complexo formado por polilisina (PLL, peptídeo catiônico sem sequência de direcionamento nuclear) e verificaram que a presença de PLL na razão molar entre 0,9 e 1,7, na presença do lipossoma catiônico eleva a eficiência de transfecção em 10-30 vezes, quando comparado à transfecção realizada somente com DNA e lipossoma catiônico.

Embora estes estudos não tenham identificado a proporção na qual todo o DNA esteja complexado com o peptídeo, percebe-se que o excesso de peptídeo é vantajoso. Em nosso caso, a quantidade de peptídeo foi propositalmente elevada da razão molar entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA de 0,5 para 1 para se garantir este excesso, uma vez que a razão molar identificada é inferior aos valores identificados nos estudos citados acima.

É válido observar que os complexos DNA-peptídeo não migraram do poço durante a eletroforese, indicando que este agregado possui tamanho muito mais elevado em relação aos componentes individuais. A determinação do tempo de eletroforese foi determinada e é apresentada no Anexo VIII.

5.4.1.2. Avaliação do diâmetro médio do complexo binário DNA-peptídeo

A complexação entre DNA e peptídeo teve que ser realizada com cuidados de agitação e controle de temperatura, pois a natureza eletrostática da agregação apresentou os mesmos problemas de precipitação que as complexações entre

DNA e DRVs. Desta forma, as complexações foram conduzidas entre 0 e 4°C e com agitação intensa (vórtice).

Apesar dos cuidados práticos, os agregados DNA-peptídeo mostraram-se de dimensões da ordem de micrômetros, tornando inviável a utilização do equipamento de “light scattering” dinâmico, o qual não utiliza a recirculação da amostra para contornar a sua sedimentação e cuja medida baseia-se no movimento Browniano das partículas. Devido ao custo dos lipídios e peptídeo, a quantidade de amostra não foi suficiente para utilização no equipamento com recirculação.

A visualização destes agregados foi possível através de microscopia óptica, (Figura 40 A e B). A aquisição de várias imagens permitiu a determinação do diâmetro médio populacional em $31 \pm 17 \mu\text{m}$, através do software Leica Qwin500 possibilitando, também, a construção de um histograma para a distribuição de tamanho das partículas (Figura 41).

Este tipo de complexo binário apresentou grande heterogeneidade de tamanho, com a coexistência de populações menores da ordem de 10 μm (cerca de 23% das ocorrências) e outras, em menor porcentagem, de 130 μm (menos de 2% das ocorrências). Apesar desta alta variabilidade, cerca de 52% da população encontra-se na faixa de 30 μm (Figura 41).

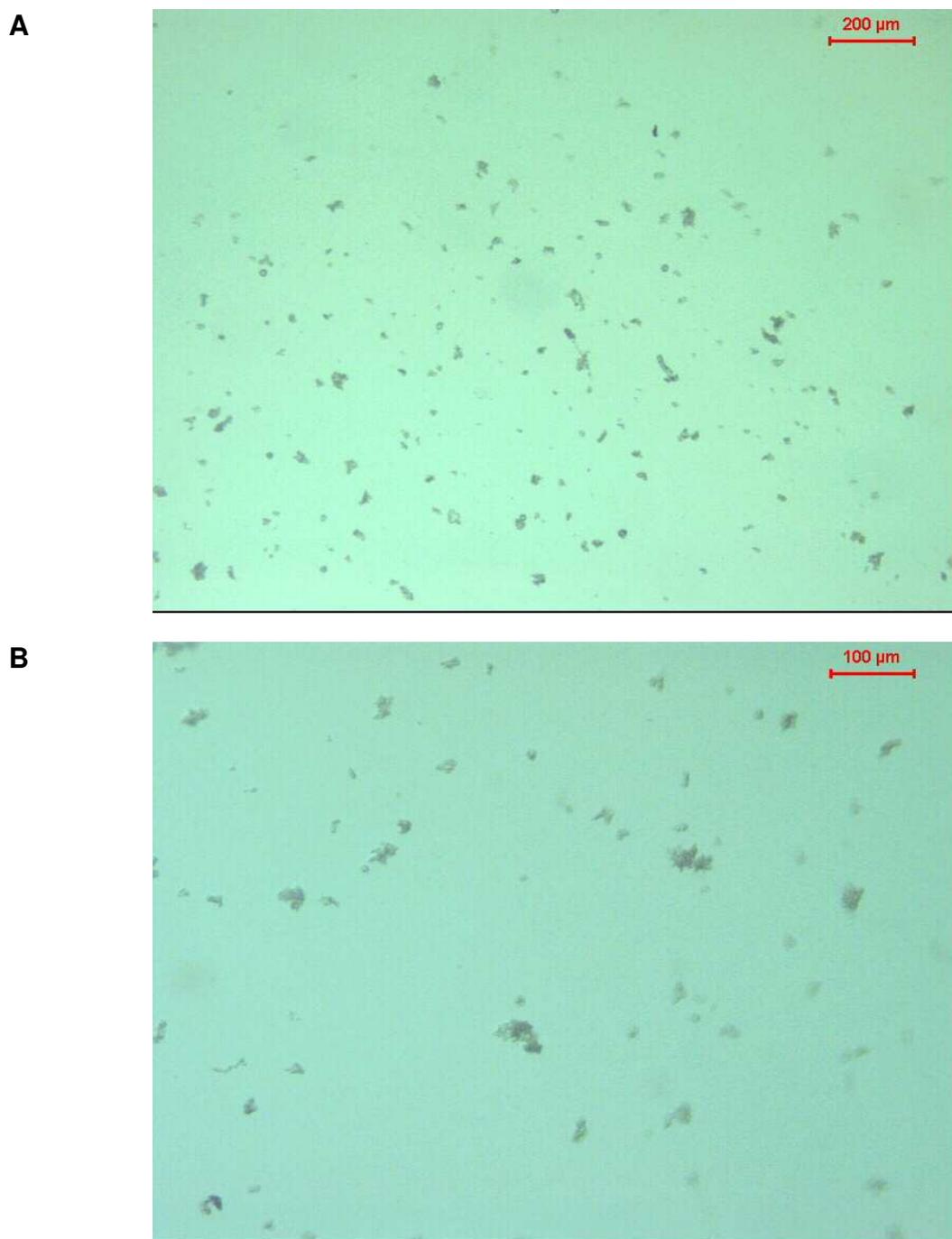


Figura 40: Micrografia do complexo intermediário formado pelo DNA e peptídeo a uma razão molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA de 1. Complexação diluída em solução salina 0,9%. Barras indicam A) 200 e B) 100 μm .

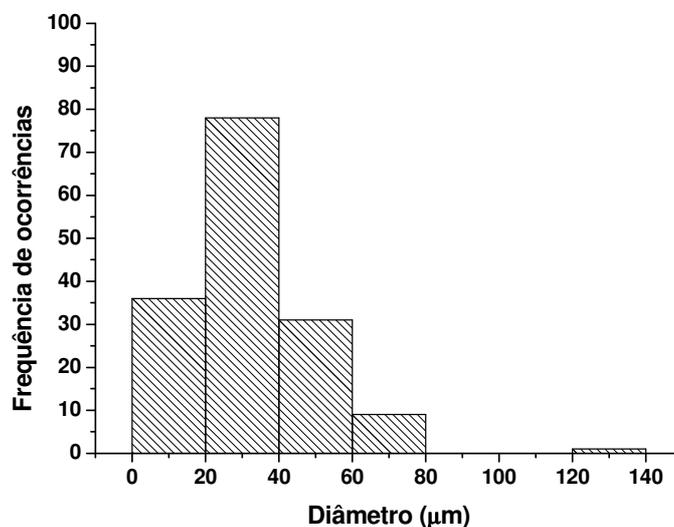


Figura 41: Histograma referente à distribuição de tamanhos do complexo binário formado por DNA e peptídeo com seqüência de aminoácidos com sinal direcionador para núcleo celular, em proporção molar entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA de 1.

Tokunaga et al., 2004 realizaram uma série de complexações entre DNA plasmideal e vários peptídeos catiônicos, encontrando vários diâmetros hidrodinâmicos, dependendo da natureza do peptídeo. Em seu trabalho, a complexação entre DNA e poli-ornitina gerou partículas com diâmetro de 120 nm, indicando que o DNA foi muito bem condensado.

Mackenzie et al., 2000, desenvolveram vários peptídeos de baixa massa molar que possuem uma série de cisteínas em sua seqüência. Nesse caso, a formação das pontes de dissulfeto são controladas através do ajuste de pH e formadas somente durante a complexação com o DNA. Este processo gerou partículas de diâmetro entre 50 e 1600 nm dependendo da natureza do peptídeo, permitindo uma boa condensação e estabilização do DNA.

A presença de grandes agregados, de diâmetro de 31 μm , na complexação entre o pVAX-Hsp65 e o peptídeo (Figuras 40 e 41) pode sugerir que não houve

condensação adequada do DNA. Isto pode estar relacionado à prévia ciclização do peptídeo, vinculada ao processo de síntese e purificação deste mesmo.

5.4.2. Caracterização do sistema ternário Lipossoma-DNA-peptídeo

Neste item são apresentadas as caracterizações do sistema ternário lipossoma-DNA-peptídeo referentes à distribuição de tamanhos e diâmetro médio hidrodinâmico, densidade de carga (item 5.4.2.1), acesso do DNA à sonda de fluorescência (item 5.4.2.2) e morfologia (item 5.4.2.3).

5.4.2.1. Determinação da distribuição de tamanhos, diâmetro médio hidrodinâmico e da densidade de carga do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo

Uma vez formado, o complexo DNA-peptídeo foi adicionado aos DRVs vazios (método descrito no item 4.4.1.8). Nessa formulação, a massa de peptídeo suficiente para atingir a razão molar entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA de 1 foi adicionada à formulação na proporção DNA/DRV de $R_{+/-} = 10$, inicialmente estabelecida a partir dos ensaios *in vivo* (formulação descrita na Tabela 4, item 4.3).

A formação do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo produziu duas populações bem definidas e estáveis ao longo de 4 dias de estocagem (8°C), (Tabela 12 e Figura 42). Uma amostra foi mantida durante 7 meses sob refrigeração em condições estéreis, mantendo o diâmetro e distribuição de tamanhos inalterado durante este período (Tabela 12 e Figura 42).

Tabela 12: Diâmetro médio hidrodinâmico das populações do complexo DRV-DNA-peptídeo ao longo da estocagem (8°C).

Tempo de estocagem	Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	
	População 1	População 2
40 minutos após complexação	273,5 ± 48,2	1078,3 ± 299,5
1 dia	266,5 ± 37,3	1122,6 ± 272,9
4 dias	262,0 ± 45,5	994 ± 237
7 meses (ii)	359,8	1049,8

(i) Diâmetros médios e desvios padrão referem-se à três complexos independentes (n=3)

(ii) Diâmetro médio sem desvio padrão pois a estabilidade refere-se a apenas uma amostra estocada durante o período.

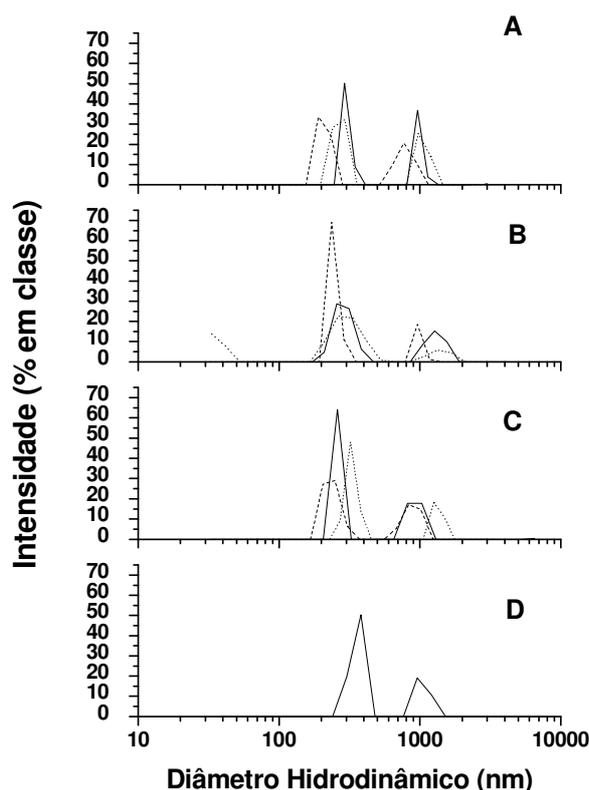


Figura 42: Distribuições de tamanho dos complexos contendo lipossomas catiônicos-DNA-peptídeo. A) Após 40 minutos de complexação; Complexos mantidos sob refrigeração com 1 dia (B), 4 (C) dias e 7 (D) meses de estocagem. Gráficos A, B e C são compostos por distribuições distintas e provenientes de três complexações independentes (n=3).

Surpreendentemente, mesmo sabendo que a complexação entre DNA-peptídeo gerou partículas grandes (da ordem de 31 μm), o complexo ternário DRV-DNA-peptídeo resultante apresentou tamanho muito menor que o complexo binário, e da mesma ordem de grandeza que os DRVs iniciais (Figura 42). Comportamento idêntido foi obtido por Tokunaga et al., 2004, onde complexos binários de DNA-peptídeo (de natureza catiônica) da ordem de 13 μm condensaram-se com a adição de lipossomas, atingindo tamanhos similares aos dos complexos formados apenas por DNA-lipossoma (diâmetro hidrodinâmico da ordem de 568,5 nm). Neste trabalho, a complexação esteve envolvida com lipossomas catiônicos contendo DMB-Chol (lipídio catiônico derivado do colesterol) e DOPE sonificados com tamanhos de partícula de diâmetro de 120 nm. Segundo os autores, propriedades estruturais e elétricas de superfície devem estar envolvidas na complexação entre os três componentes. Diante deste comportamento, os autores assumiram que o complexo ternário encontra-se muito bem condensado.

Os resultados obtidos neste trabalho são coerentes com os da literatura, ressaltando que os casos anteriores referem-se à lipossomas preparados por sonicação. Não existe na literatura preparação envolvendo complexos ternários que utilizem DRVs.

A densidade de cargas do complexo ternário foi avaliada através do potencial zeta de 4 amostras independentes e apresentou valor médio de $+11,3 \pm 3,4$ mV. Este valor é inferior ao observado para a estrutura DRV-DNA ($+27,3 \pm 2,3$, Tabela 8), indicando que existe uma menor carga positiva líquida na superfície deste colóide. Este comportamento é surpreendente uma vez que estamos adicionando mais um componente de natureza catiônica (peptídeo). Este fenômeno pode estar associado ao próprio processo de complexação que envolve 2 etapas: a primeira com a combinação entre DNA e peptídeo (de natureza catiônica), no qual já ocorre complexação eletrostática, seguida da adição do lipossoma DRV. A interação DNA-peptídeo-DRV pode gerar um colóide com densidade de cargas resultante menor que o DRV-DNA, sugerindo que esteja

ocorrendo condensação entre os três componentes. Isto pode ser confirmado pelo desaparecimento da população de 31 μm identificada para o complexo binário, conforme identificado nas leituras de distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico (Tabela 12, Figura 42).

5.4.2.2. Acesso da sonda de fluorescência

O complexo DNA-peptídeo também foi caracterizado em termos do acesso da sonda de fluorescência específica para dsDNA (DNA dupla fita) (método descrito no item 4.5.7), em ensaio similar ao já realizado para as estruturas lipossomais DRV-DNA e lipoplexos (item 5.2.5). Neste ensaio, vários complexos entre o ácido nucleico e o peptídeo foram formados em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e cargas negativas do DNA, tendo água como meio reacional (a presença de altas concentrações de sal reduz o sinal de fluorescência). O gráfico da intensidade de fluorescência dos complexos binários é apresentado na Figura 43.

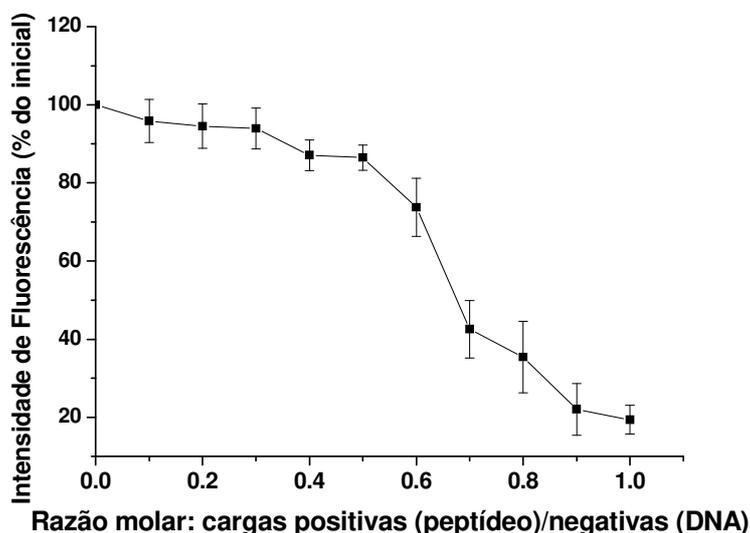


Figura 43: Intensidade de fluorescência da sonda PicoGreen dos complexos DNA-NLS em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA, em água ultra pura (Milli-Q). A intensidade de fluorescência em termos de % do inicial refere-se ao DNA na

ausência de peptídeo. As barras de erro referem-se a três complexações independentes para cada ponto da curva (n=3).

As complexações foram conduzidas mantendo-se fixa a concentração de DNA para as várias razões molares entre as cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA, sendo o perfil de fluorescência expresso em termos de percentagem relativa à intensidade de fluorescência do DNA livre. Na Figura 43, verifica-se que à medida que a quantidade de peptídeo é elevada na complexação (elevação da razão molar), ocorre uma redução da intensidade de fluorescência emitida pela sonda Pico Green, revelando que o DNA disponível para a intercalação com a sonda diminui. Isso significa que elevando-se a razão molar, o DNA tende a complexar-se preferencialmente com o peptídeo, diminuindo o acesso da sonda para intercalação com o ácido nucleico.

É interessante notar na Figura 43, que as razões molares entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA entre 0,1 e 0,4, apresentaram pequena redução de intensidade de fluorescência (entre 90 e 80%), com um decaimento mais acentuado para razões molares maiores que 0,5 e tendendo a estabilizar-se em 20% para razões entre 0,9 e 1.

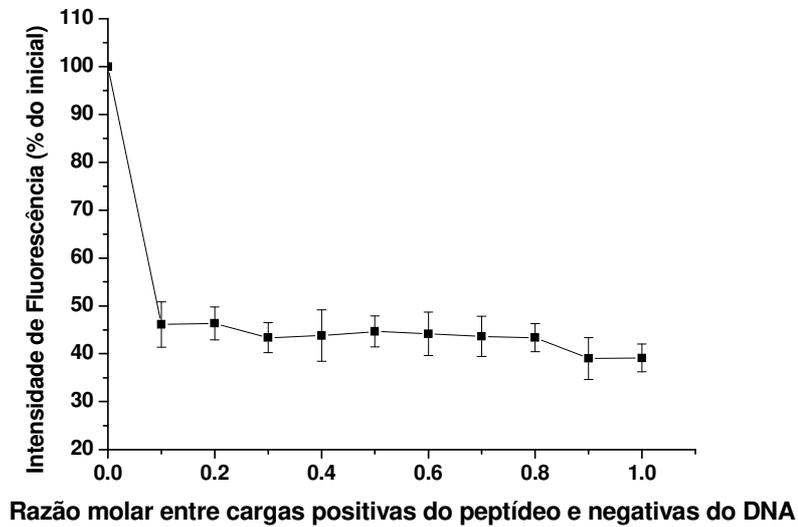
Na eletroforese em gel de agarose pode-se detectar que a partir de razões molares acima de 0,5 (item 5.4.1.1), todo o DNA apresenta-se complexado com o peptídeo. Porém, de acordo com o perfil da intensidade de fluorescência, apesar do DNA estar todo complexado com o peptídeo nesta razão molar, ainda existe acesso para a sonda de fluorescência, como se ainda existissem sítios disponíveis para a intercalação com o DNA. Esse fato é evidenciado pela queda de intensidade de fluorescência acentuada entre 0,5 e 0,9. Razões molares acima de 0,9, o acesso tende a estabilizar-se em 20%. Este comportamento pode estar associado à natureza cíclica do peptídeo, que permite a formação de complexos DNA-peptídeo com baixo grau de condensação do DNA devido à formação de partículas de tamanho elevado (item 5.4.1.1), favorecendo o acesso da sonda fluorescente no complexo.

Comportamento semelhante foi encontrado por Tokunaga et al., 2004 para diferentes peptídeos utilizando o brometo de etídio como sonda de fluorescência. Em seu estudo, a redução da fluorescência (% da inicial) até um patamar constante, depende da natureza do peptídeo. Quanto menor o valor percentual da intensidade de fluorescência neste patamar, maior a afinidade entre o peptídeo e o DNA. Dentre os vários peptídeos estudados, o que proporcionou maior redução da intensidade de fluorescência foi o Poli-L-ornitina (PLO, massa molar 140.000), atingindo valores de intensidade de fluorescência (% do inicial) de 20%, semelhantes ao encontrado para o peptídeo deste trabalho, estudado em razão molar entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA de 1.

Portanto, a escolha da razão molar entre as cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA 1 para as formulações que serão utilizadas para os futuros ensaios *in vivo*, garante que o empacotamento está no nível de acessibilidade mais baixo de 20% (Figura 43).

O acesso da sonda de fluorescência também foi avaliada para o complexo ternário DRV-DNA-NLS (Figura 44). Nesse caso, utilizou-se a quantidade de DNA e DRV equivalente à proporção DRV/DNA das formulações *in vivo* (Razão de cargas lipídio catiônico+/DNA- 10), em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA .

A



B

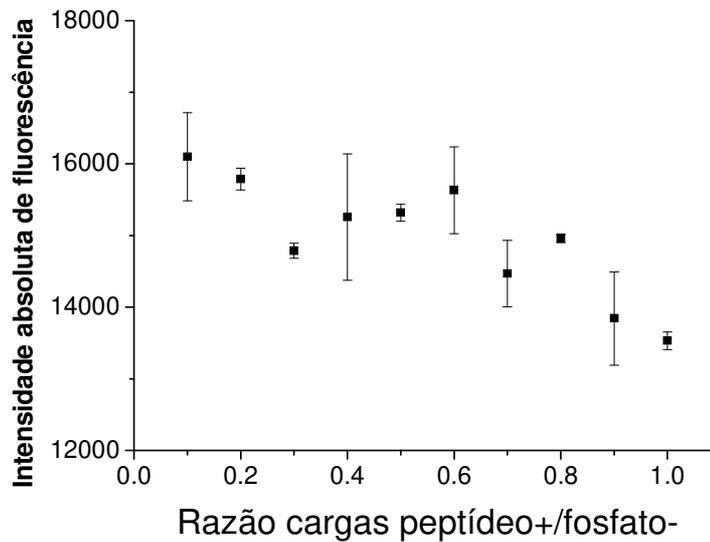


Figura 44: Intensidade de fluorescência da sonda PicoGreen dos complexos ternários DRV-DNA-peptídeo, na proporção DRV/DNA ($R_{+/-}$ 10) já estabelecida para os teste *in vivo*; porém, em várias razões molares entre cargas positivas do peptídeo e PO_4^{-3} do DNA, em água ultra pura (Milli-Q). A) A intensidade de fluorescência em termos de % do inicial refere-se ao DNA livre, na ausência de peptídeo e lipossomas. B) Intensidade de fluorescência absoluta para o sistema ternário, em diferentes quantidade de peptídeo catiônico. As barras de erro referem-se a três complexações independentes para cada ponto da curva ($n=3$).

A Figura 44 A mostra a intensidade de fluorescência relativa ao DNA livre, onde identifica-se que o acesso da sonda ao DNA mantém-se constante a $43 \pm 4,7\%$. O mesmo comportamento foi encontrado também por Tokunaga et al., 2004 para complexos ternários formados por diferentes peptídeos, com acesso da sonda de fluorescência entre 20 e 30%, para lipossomas sonicados. Segundo os autores, esta redução indica uma elevada afinidade entre o DNA e os lipossomas catiônicos. De qualquer forma, é interessante notar, que independentemente da proporção de peptídeo, a porcentagem de fluorescência praticamente não se altera. Esse comportamento pode ser explicado pelo grande excesso de lipossomas catiônicos frente à quantidade de DNA e peptídeo utilizados na formulação, de modo que qualquer influência do peptídeo é insignificante.

A Figura 44 B apresenta a intensidade absoluta de fluorescência da sonda ao DNA no sistema ternário Lipossoma-DNA-peptídeo, em várias concentrações de peptídeo, onde tem-se uma tendência muito discreta de decaimento da fluorescência à medida que se eleva a quantidade de peptídeo. Este decaimento poderia ser mais intenso se razões peptídeo+/fosfato- maiores que 1 fossem avaliadas, sugerindo que, à medida que se eleva a quantidade de peptídeo, para a mesma quantidade de lipossomas catiônicos e DNA, menor a intensidade de fluorescência, e conseqüentemente, menor acesso da sonda de fluorescência ao DNA, sugerindo a formação do complexo ternário.

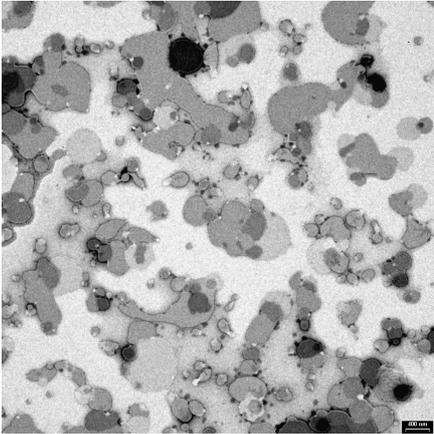
Os perfis de intensidade de fluorescência (Figuras 43 e 44A), baseados na porcentagem de fluorescência do DNA livre, caracterizam o acesso da sonda fluorescente ao DNA nas estruturas lipídica. Para o DRV-DNA em $R_{+/-} 10$, a acessibilidade encontrada foi de $39,8 \pm 2,0\%$ (item 5.2.5) e a comparação deste valor com o encontrado para o complexo DRV-DNA-peptídeo ($43 \pm 4,7\%$) revela que praticamente não ocorre alteração da acessibilidade da sonda de DNA com a inclusão do peptídeo. Este comportamento pode estar, mais uma vez, associado ao excesso de lipossoma catiônico empregado na formulação.

5.4.2.3. Morfologia dos Complexos Ternários DRV-DNA-peptídeo

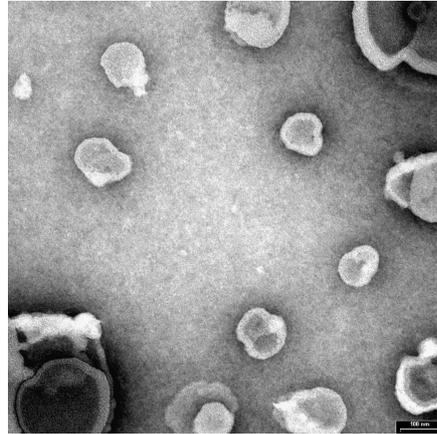
A morfologia do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo foi avaliada através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e são apresentadas nas Figuras 45 A, B, C e D e 46 A, B, C e D.

As morfologias obtidas para o complexo ternário ns Figuras 45 A e B são inicialmente semelhantes às observadas para DRVs vazios (Figura 23) e muito distintas das observadas para DRV-DNA(Figura 25). As imagens para DRV-DNA apresentaram várias tortuosidades presentes na superfície externa dos lipossomas, que, juntamente com outras técnicas de DSC e cálculo da área superficial, sugerem que o DNA esteja na superfície mais externa. Quando uma análise mais criteriosa é realizada, verifica-se que o complexo ternário apresenta algumas tortuosidades que podem ser identificadas nas Figuras 46 A e B, porém, em menor índice de ocorrência que o encontrado para DRV-DNA (Figura 25), com morfologia intermediária entre DRV(DNA) (Figura 24) e DRV-DNA (Figura 25). A presença do peptídeo que já estava previamente complexado com o DNA, deve possivelmente alterar o empacotamento da estrutura.

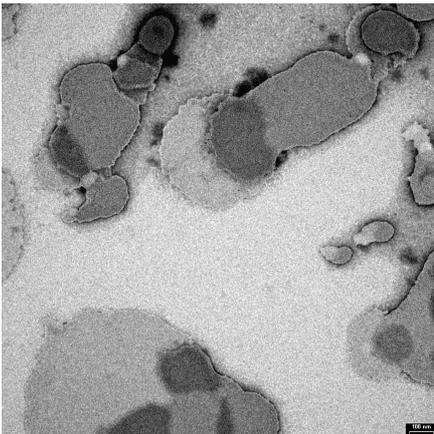
A



B



C



D

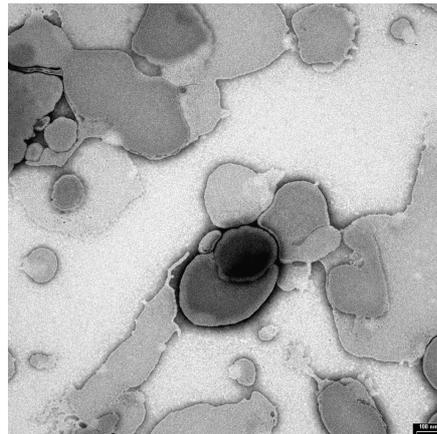


Figura 45: Micrografia do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo. As barras indicam A) 400 nm, B) 100nm, C) 100 nm, D) 100 nm.

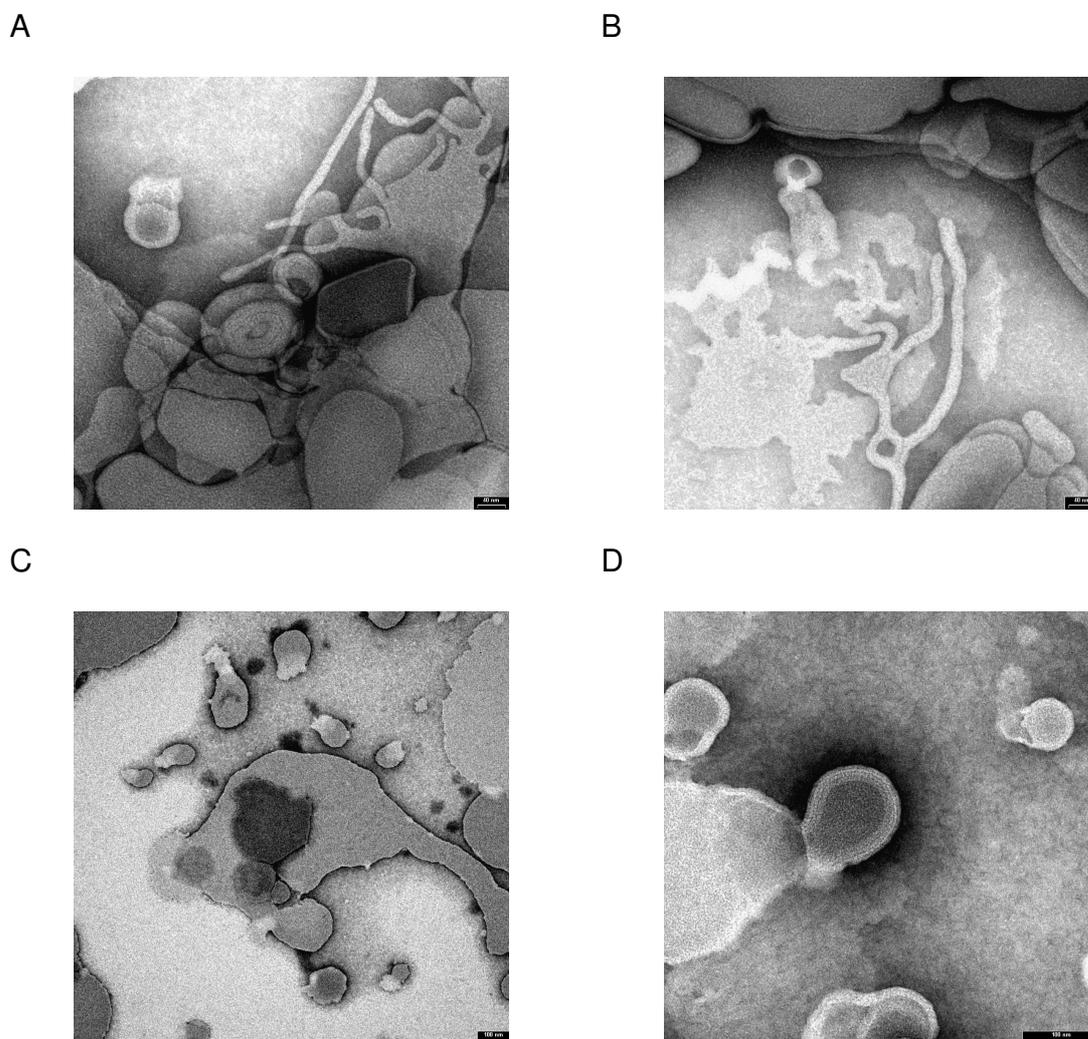


Figura 46: Micrografia do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo. As barras indicam A) 40 nm, B) 40nm, C) 100 nm, D) 100 nm.

A Figura 47 mostra uma sequência de micrografias com maior ampliação na qual é possível identificar maiores detalhes de morfologia tais como a presença de lamelas concêntricas que sugerem a natureza multilamelar dos lipossomas formados (Figuras 47 E e F). Sabe-se que nas micrografias, a visualização das lamelas só é possível quando estas se encontram de forma bastante organizada e o feixe de elétrons incide perpendicularmente à estrutura.

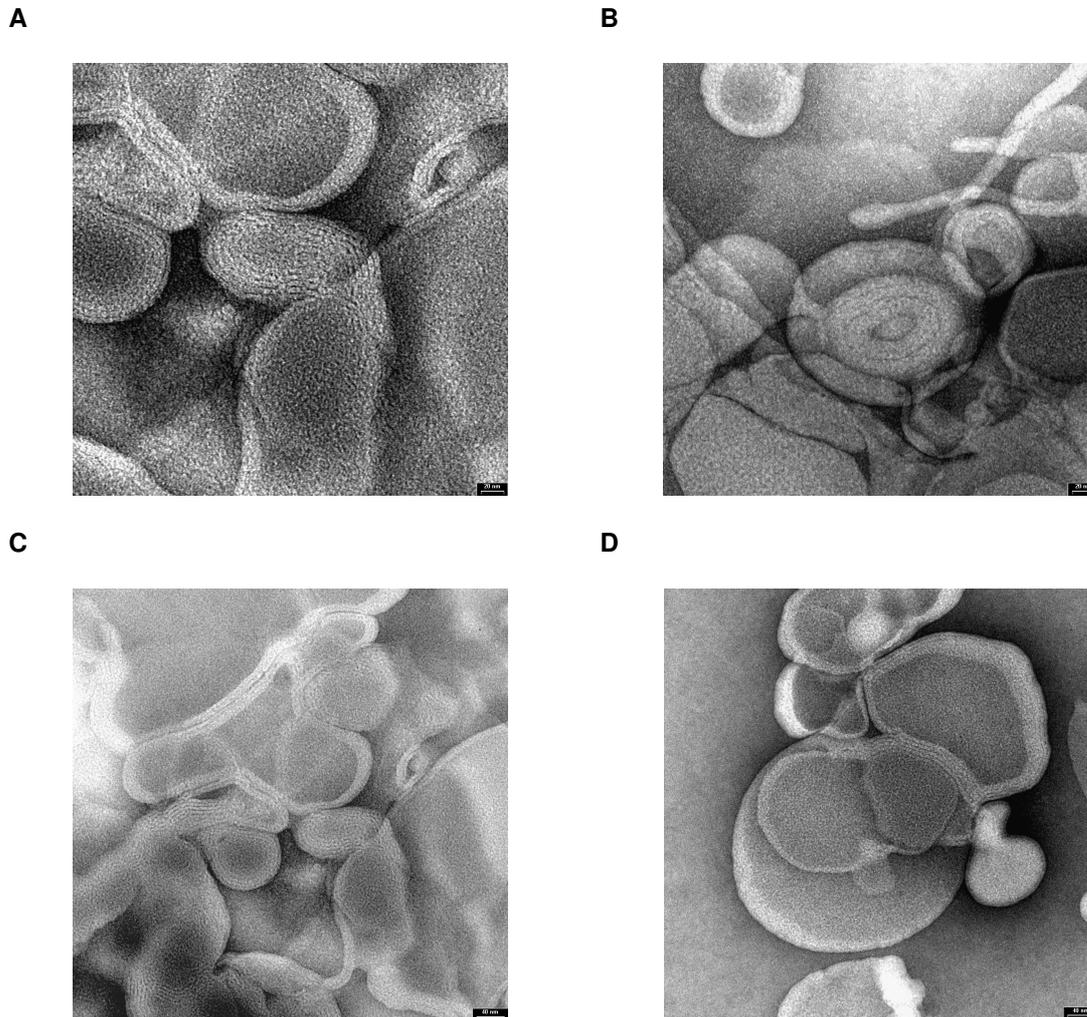


Figura 47: Microscopia eletrônica de transmissão do complexo ternário DRV-DNA-NLS. As barras indicam E) 20 nm, F) 20nm, C) 40 nm, D) 40 nm.

Nestas micrografias (Figuras 45, 46 e 47) também não se identifica a presença de grandes agregados que poderiam estar relacionados ao complexo binário DNA-peptídeo revelados através de microscopia óptica (item 5.4.1.2). Esse fato, aliado à diferença morfológica encontrada entre os complexos ternário e binário, sugere que o DNA-peptídeo encontra-se totalmente incorporado à estrutura lipossomal. Associando, ainda, os resultados do acesso da sonda de fluorescência (item 5.4.2.2), e da alteração da densidade de carga (item 5.4.2.1),

pode-se inferir que o DNA-peptídeo encontra-se nas camadas mais externas dos lipossomas porém não tão exposto na superfície quanto no DRV-DNA (Figura 25).

Infelizmente, muitos dos estudos que envolvem estes três tipos de componentes concentram-se principalmente o efeito biológico, constatando que a transfecção é elevada com a adição destes tipos de peptídeos nas formulações, sem um aprofundamento do fenômeno físico-químico envolvido na complexação e da avaliação da força motriz que promove a formação deste tipo de “complexo ternário”. Porém, vale a pena ressaltar as principais evidências do comportamento do complexo ternário em algumas pesquisas:

- É interessante notar que a complexação entre DNA e o peptídeo catiônico (M9-ScT) não eleva significativamente a transfecção *in vitro*, mas a inclusão de lipossomas catiônicos, no caso lipofectamina, a eficiência é elevada (Byrnes et al., 2002).
- Resultados similares aos anteriormente citados também foram reportados por Gao & Huang, 1996, porém, nestes estudos utilizou-se o polipeptídeo polilisina (PLL), sem sequência de direcionamento nuclear. A ausência de lipossomas, isto é, complexos formados somente por PLL e DNA geram transfecções ineficientes, indicando que a elevada taxa de transfecção depende da presença de lipossomas catiônicos. Outro ensaio bastante interessante que estes autores realizaram foi a ordem de complexação entre os três componentes que forma o complexo ternário. Uma vez que lipossomas catiônicos e PLL competem pela ligação eletrostática com o DNA, dois protocolos foram preparados: (i) no primeiro, o DNA foi complexado inicialmente com o lipossoma catiônico e em seguida (após 10 minutos de incubação), adicionou-se a PLL; (ii) no segundo, o DNA foi complexado inicialmente com a PLL e, em seguida, após 10 minutos de incubação, complexado com o lipossoma catiônico. Os resultados mostraram que quando o DNA foi inicialmente complexado com os lipossomas catiônicos, não ocorre transfecção em níveis satisfatórios, enquanto o protocolo com a

complexação inicial entre DNA e PLL foi significativamente maior. Segundo os autores, o protocolo para preparação dos complexos pode afetar a estrutura e função dos complexos, afetando a atividade ótima. Além disso, a presença de PLL no complexo ternário evita a formação de grandes complexos, possivelmente pela sua direta participação na complexação.

Neste contexto, quando se fala complexação entre um complexo binário (DNA-peptídeo), teoricamente com os sítios disponíveis para interações eletrostáticas totalmente ocupados, com os lipossomas catiônicos, permanece a dúvida de qual seria a força motriz para que este complexo ternário se forme. As evidências experimentais desta pesquisa, bem como as de outros autores citados neste capítulo apontam para o fato que os três componentes interagem entre si, com o DNA provavelmente interfaceando estas interações e que a presença do lipossoma catiônico é fundamental para a garantia da eficiência de transfecção (Byrnes et al., 2002).

5.5. Análise do escalonamento da produção de lipossomas

O estudo de ampliação de escala foi realizado para a obtenção de estruturas lipossomais funcionais adequadas para a desidratação-rehidratação e subsequente incorporação do DNA.

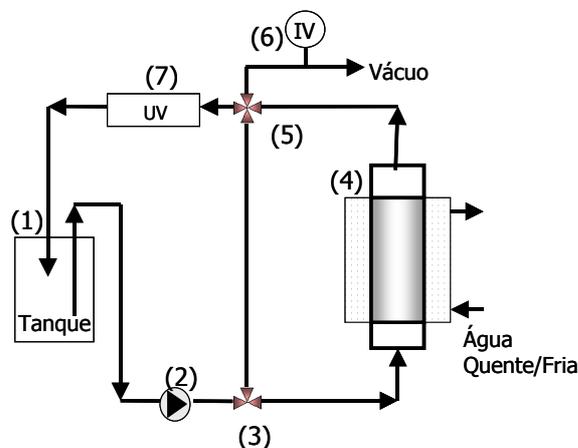
A análise de produção destes lipossomas em processo escalonável abordou os seguintes aspectos: (i) concepção do processo (item 5.5.1), (ii) cinética da formação dos lipossomas (item 5.5.2), (iii) caracterização dos lipossomas produzidos na unidade escalonável (item 5.5.3), determinação da espessura do filme lipídico adsorvido em tubo capilar (item 5.5.4) e (iv) simulação da produção mássica de lipossomas a partir de um modelo matemático (item 5.5.5).

5.5.1. Concepção do Processo

O início do estudo de aumento de escala de lipossomas catiônicos correspondeu ao projeto de uma unidade de característica escalonável para a produção de lipossomas, baseando-se no trabalho já desenvolvido em nosso grupo de pesquisa com sistema multitubular (Carneiro & Santana, 2004) e em processo patenteado por Tournier et al., 1999.

A concepção do processo escalonável de obtenção dos lipossomas é baseada na adsorção dos lipídios na superfície interna de tubos de vidro. O escalonamento se dá pelo aumento do comprimento ou número de tubos. Conforme demonstrado por Carneiro & Santana, 2004, e o que acontece em um único tubo pode ser extrapolado para um feixe de tubos.

A Figura 48 apresenta o fluxograma de processo de obtenção dos lipossomas, onde neste trabalho, a adsorção foi realizada em um único tubo capilar.



(1) Tanque; (2) Bomba peristáltica; (3) Válvula 4 vias; (4) Coluna de adsorção de vidro com camisa para controle do aquecimento; (5) Válvula 4 vias; (6) Indicador de vácuo (IV); (7) Espectrofotômetro para medida on line de absorbância

Figura 48: Fluxograma de processo para produção de lipossomas catiônicos a partir de estruturas lipídicas secas obtidas no interior de capilar de adsorção em leito fixo.

O processo completo é basicamente composto por três principais etapas operacionais: (i) Adsorção dos lipídios em tubo capilar; (ii) Secagem sob vácuo e temperatura controlados no capilar; (iii) Hidratação da estrutura lipídica seca, sendo cada etapa descrita a seguir:

- (i) Adsorção dos lipídios no tubo capilar: Os lipídios foram dispersos em solução alcoólica e adicionados ao tanque de adição [(1) , Figura 48]. Esta solução foi recirculada no capilar [(4), Figura 47] através de bomba peristáltica [(2) Figura 48], durante durante 40 minutos para assegurar o equilíbrio na adsorção.

- (ii) Secagem sob vácuo e controle de temperatura no capilar: Após a recirculação, o capilar foi drenado para que o excesso de solução alcoólica de lipídio fosse retirado. Secou-se o capilar sob vácuo e controle adequado de temperatura na coluna e leve fluxo de nitrogênio, sem alterar o controle do vácuo. O indicador de vácuo [(6), Figura 48] instalado na linha de vácuo permitiu que a secagem fosse controlada. A coluna possuía jaqueta térmica que permite o controle de temperatura através da circulação de água com temperatura controlada em banho termostático. A montagem apresentada na Figura 48 permitiu que as linhas de carregamento e descarregamento da coluna fossem limpas durante a etapa de secagem. Isto foi possível devido à instalação da linha de *by pass* da coluna e das válvulas 4 vias [(3) e (5), Figura 48].

- (iii) Hidratação da estrutura lipídica seca: Após a secagem, a fase aquosa foi adicionada ao tanque de alimentação da coluna [(1), Figura 48] , onde a recirculação permitiu que as estruturas lipídicas secas adsorvidas nas paredes do capilar fossem hidratadas, permitindo a agregação e conseqüente formação de lipossomas. A instalação de uma célula de fluxo contínuo em espectrofotômetro [(7), Figura 48) permitiu que fosse realizada a leitura contínua de absorbância, facilitando o acompanhamento da hidratação do filme seco.

A escolha da capacidade da unidade de bancada baseou-se em aspectos econômicos e de capacidade mínima do sistema. Em termos econômicos, o ideal seria que o menor volume possível fosse trabalhado, porém em termos de equipamento, capacidade de bombeamento e volume mínimo para leitura de absorvância o volume mínimo operacional foi de 3 mL.

O solvente inicialmente utilizado na obtenção dos lipossomas catiônicos para os testes *in vivo* pelo método de Bangham foi o clorofórmio, porém sua elevada toxicidade e limitação dos equipamentos para ampliação de escala (bomba, mangueiras) quanto à resistência química a este solvente levaram à escolha de outro solvente orgânico. O etanol mostrou-se um solvente adequado, pois permite a dispersão dos lipídios e os equipamentos tais como a coluna, mangueiras e válvulas também são resistentes a este solvente, além de seu baixo grau de toxicidade. Nestas condições, a temperatura de adsorção teve que ser estabelecida em 35°C, pois o lipídio DOPE, que é insolúvel à temperatura ambiente em etanol torna-se solúvel a esta temperatura.

A condição de secagem foi estabelecida em termos do binômio temperatura e pressão (vácuo). A temperatura de secagem foi a mínima possível uma vez que os lipídios EPC, DOPE e DOTAP devem ser processados na temperatura mais baixa possível. A bomba de vácuo Edwards utilizada neste sistema tem a capacidade de atingir até 650 mmHg de vácuo relativo, sendo desta forma possível encontrar a mínima temperatura para que ocorra a evaporação do etanol. A partir de uma relação entre pressão de vapor e temperatura apresentada por Perry, 1997 (Anexo IX), a temperatura que promove evaporação deste solvente, na condição de vácuo anteriormente citada é 40°C, porém assumindo um fator de segurança (possíveis perdas térmicas do sistema), a temperatura de processo durante a secagem foi estabelecida em 45°C. Este controle de temperatura é realizado através da instalação de uma camisa de circulação de água na coluna conectada a um banho termostático que promove a recirculação e manutenção da temperatura da água de aquecimento.

5.5.2. Caracterização físico-química dos lipossomas

Os experimentos realizados na unidade escalonável em tubo capilar utilizaram os mesmos lipídios envolvidos na formulação utilizada no método de Bangham para os testes *in vivo* e *in vitro*. Assim, a proporção molar EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% foi mantida, variando-se somente a concentração lipídica total na fase alcoólica.

A validação da unidade escalonável é uma etapa importante no desenvolvimento técnico, pois é a garantia que os lipossomas produzidos nesta unidade possuem as mesmas características físico-químicas dos obtidos pelo método de Bangham.

As técnicas de caracterização utilizadas foram (i) identificação qualitativa da presença dos lipídios funcionais através de espectrometria de massa (item 5.5.2.1). (ii) diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos (item 5.5.2.2) e (iii) densidade de carga – potencial zeta (item 5.5.2.3).

5.5.2.1. Identificação qualitativa da presença dos lipídios funcionais nos lipossomas produzidos pela unidade escalonável

A técnica de espectrometria de massa, descrita no item 4.5.11, foi utilizada para identificação dos três lipídios (EPC/DOPE/DOTAP) nos lipossomas produzidos pela unidade escalonável em sistema capilar. A Figura 49 apresenta os espectros de massa para a solução alcoólica inicial de 70 mM, contendo os três lipídios (EPC/DOPE/DOTAP) e a dispersão lipossomal obtida após a hidratação do filme seco de lipídios.

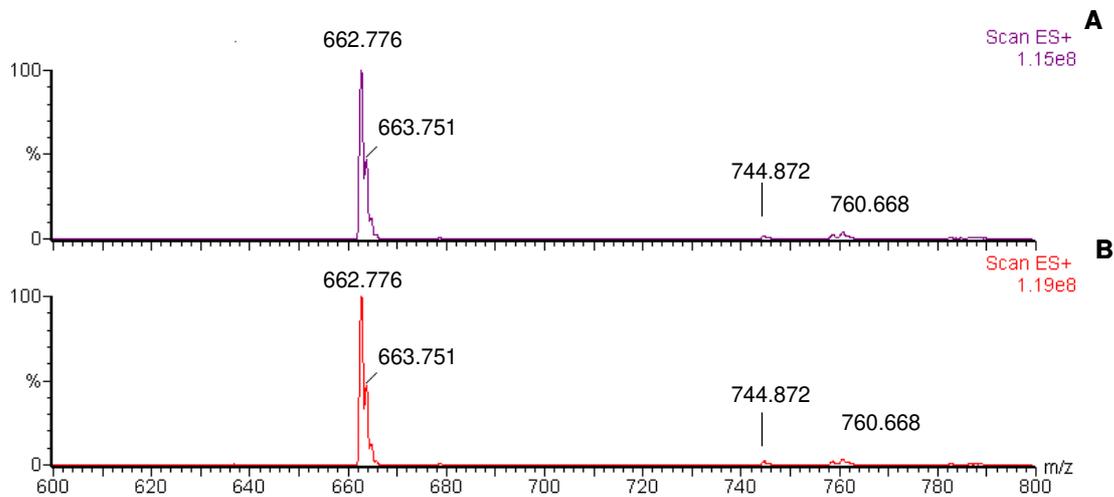


Figura 49: Espectros de massa para a solução alcoólica inicial de 70 mM, contendo os três lipídios (EPC/DOPE/DOTAP) (A) e o respectivo lipossoma produzido na unidade escalonável (B).

Na Figura 49 pode-se identificar a presença dos três lipídios, cujas massas molares de 662,776, 744,872 e 760,668 correspondem ao DOTAP, DOPE e EPC, respectivamente.

É válido ressaltar que as diferentes intensidade relativas (ordenadas dos gráficos da Figura 49) entre os três lipídios, evidenciada pela grande diferença de altura dos picos, não é diretamente proporcional à concentração dos componentes na solução. Existe um fator relacionado à capacidade de ionização, que aliado à abundância do composto na amostra, gera a intensidade relativa de emissão, a qual está indicada em termos percentuais na ordenada da Figura 49. No caso do DOTAP, sua capacidade de ionização é muito superior à dos demais componentes, motivo pelo qual seu pico na Figura 49 A e B é maior.

Vários testes foram realizados com o intuito de tentar quantificar os lipídios através de espectrometria de massa, mas a característica muito similar das moléculas e a elevada capacidade de ionização do DOTAP foram os efeitos limitantes.

De qualquer forma, a partir da técnica empregada, pode-se verificar a presença embora qualitativa, dos três lipídios utilizados na composição dos lipossomas produzidos.

5.5.2.2. Distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico

A distribuição de tamanhos e o diâmetro hidrodinâmico (item 4.5.3), foi avaliada para uma grande faixa de concentração lipídica total inicial na fase alcoólica, conforme apresentado na Figura 50.

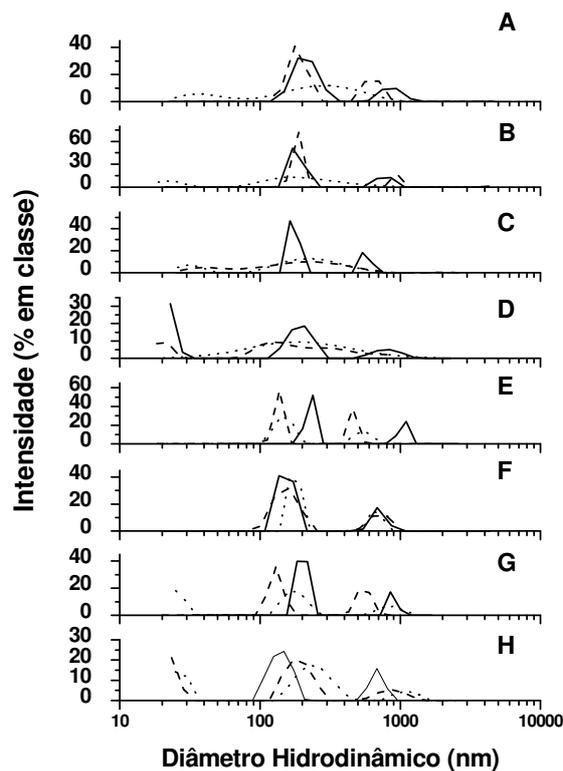


Figura 50: Distribuição de tamanhos dos lipossomas obtidos a partir de uma dispersão alcoólica de lipídios (EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar) em sistema capilar. Concentração total de lipídios na fase alcoólica: A) 5mM; B) 10mM; C) 20mM; D)30 mM; E) 40mM; F) 50mM; G) 60mM; H) 70 mM. Cada distribuição foi construída em triplicata independente (n=3).

A Figura 50, mostra que em todas as concentrações de lipídios totais (5 a 70 mM) foi possível encontrar um perfil de distribuição de tamanhos com as duas populações características dos lipossomas contendo EPC/DOPE/DOTAP, similares às encontradas pelo método de Bangham (Figura 15 A). As diferenças de distribuições entre as replicatas independentes, para uma mesma concentração total de lipídios, pode estar relacionada às variabilidades inerentes da repetição ou da própria técnica de medida em espalhamento de luz. Nestas condições, pode-se inferir que os lipossomas produzidos na unidade escalonável apresentaram o mesmo comportamento para as diferentes concentrações estudadas, com duas populações de diâmetro médio hidrodinâmico de $197,55 \pm 50,1$ e $890,2 \pm 488,5$ nm.

Os lipossomas hidratados que foram obtidos a partir do método laboratorial de Bangham (Figura 15 A) apresentaram 2 populações com diâmetros médios de 392 ± 75 e 1729 ± 398 . Estes resultados mostram que considerando os desvios associados, ambos os lipossomas são semelhantes em relação ao diâmetro médio.

5.5.2.3. Densidade de carga – Potencial zeta

A densidade de carga dos lipossomas produzidos em unidade escalonável a partir de solução alcoólica de 30 mM e de lipossomas hidratados (método laboratorial de Bangham) foi avaliada através do potencial zeta, cujos valores são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de potencial zeta para os lipossomas produzidos pelo método da Bangham e pela unidade escalonável

Tipo de Lipossoma	Potencial Zeta (mV \pm SD) (i)
Escala laboratorial (Bangham)	56,0 \pm 6,2
Unidade escalonável	55,0 \pm 4,5

(i) *SD: Desvio padrão para 3 amostras independentes.*

(ii) *O meio de dispersão para as medidas foi água Milli-Q, o mesmo utilizado para a produção dos lipossomas em escala laboratorial e o em unidade de adsorção em tubo capilar.*

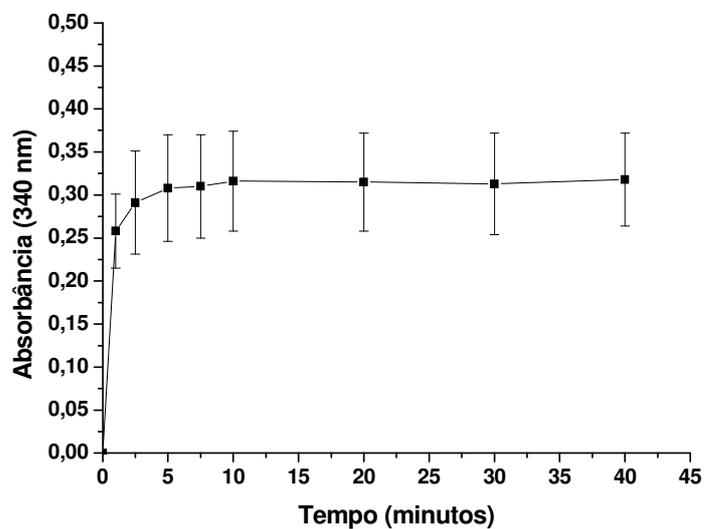
O potencial zeta dos lipossomas produzidos pelos dois métodos (escalonável e laboratorial) apresentaram valores equivalentes, indicando que a densidade de cargas permanece inalterada. Sabe-se que a densidade de cargas pode ser facilmente alterada caso haja variação de lipídio catiônico (DOTAP) na composição e conformação lipossomal (Perrie & Gregoriadis, 2000). Portanto conclui-se que os lipossomas produzidos em unidade escalonável são semelhantes em propriedades físico-químicas àqueles produzidos por método laboratorial.

A partir desses resultados pode-se inferir que a adsorção no interior do tubo capilar ocorre sem competição entre os lipídios, reproduzindo, portanto, a mesma estrutura obtida pelo método de Bangham.

5.5.3. Cinética da formação dos lipossomas

A cinética de formação dos lipossomas na unidade escalonável foi avaliada para duas concentrações iniciais de lipídios totais na fase alcoólica (50 e 60 mM), através do acompanhamento da absorbância a 340 nm ao longo do tempo na fase de hidratação (após adsorção e secagem) (método descrito no item 4.5.9). A Figura 51 apresenta a evolução das absorbâncias ao longo da etapa de hidratação para concentrações iniciais de lipídio total de 50 e 60 mM (na fase alcoólica).

A



B

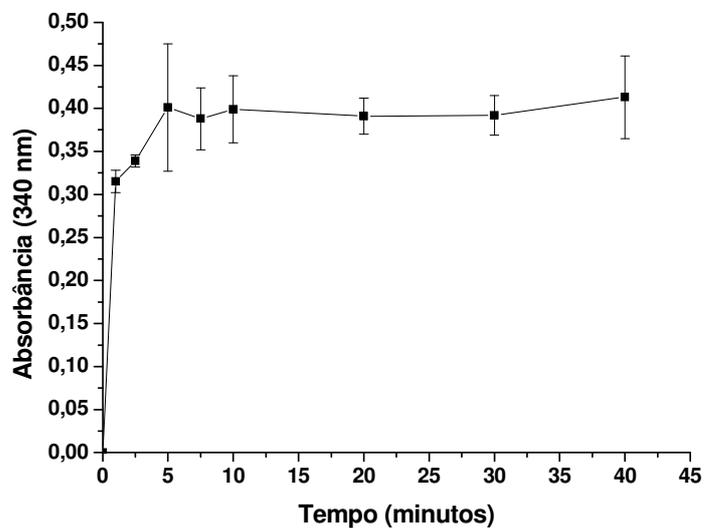


Figura 51: Cinética de formação de lipossomas cationicos compostos por EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar), em termos de absorbância a 340 nm, a partir de uma dispersão inicial em fase alcoólica com concentração total de lipídios de A) 50mM e B) 60 mM. Os desvios padrão referem-se às triplicatas (n=3).

A absorvância medida a 340 nm é proporcional ao número de vesículas presentes na solução e seu respectivo diâmetro. Pode, portanto, ser correlacionada com a concentração total de lipídios na dispersão. Desta forma, uma curva de absorvância a 340 nm em várias concentrações totais de lipídios foi construída a partir de uma solução lipossomal de concentração total conhecida e é apresentada na Figura 52.

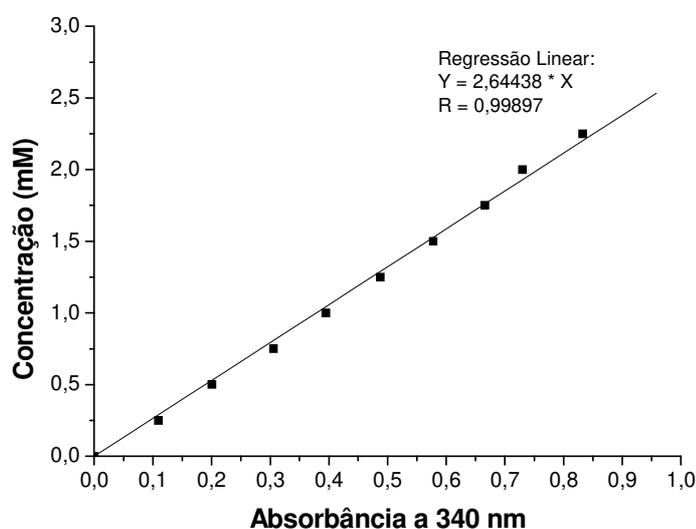
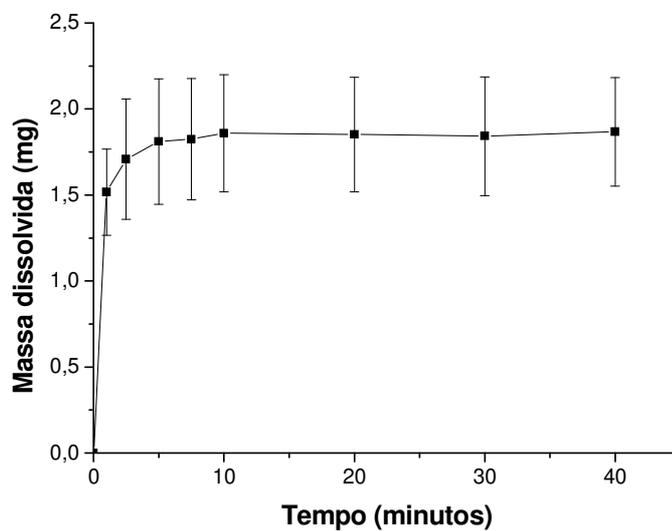


Figura 52: Relação entre concentração de fosfolipídios e absorvância a 340 nm.

A partir das informações das Figuras 51 e 52, e levando-se em consideração que não há variação do tamanho dos lipossomas ao longo da hidratação, foi possível encontrar uma relação entre absorvância a 340 nm e a concentração total de lipídios, permitindo a construção de um gráfico da formação mássica dos lipossomas ao longo do tempo, conforme apresentado na Figura 53.

A



B

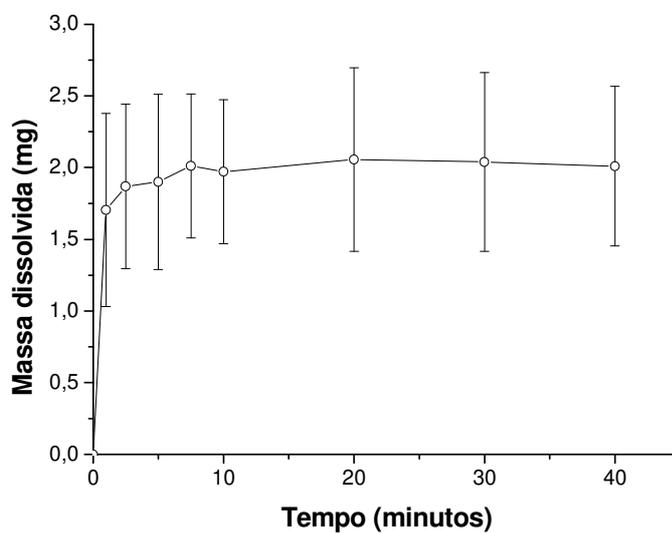


Figura 53: Cinética de formação de lipossomas catiônicos compostos por EPC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar), em termos de massa dissolvida, a partir de uma dispersão inicial em fase alcoólica com concentração total de lipídios de A) 50mM e B) 60 m. Os desvios padrão referem-se às triplicatas (n=3).

A partir da Figura 53 e admitindo que toda a massa de lipídios inicialmente adsorvida foi dissolvida, pode-se determinar a quantidade de massa adsorvida no sistema, possibilitando o cálculo da capacidade de adsorção do sistema para as duas concentrações estudadas. Como a área de adsorção é $5,78 \text{ cm}^2$, tem-se que a capacidade de adsorção é $0,32$ e $0,34 \text{ mg/cm}^2$ para as concentrações iniciais de 50 e 60 mM , respectivamente.

5.5.4. Determinação da espessura do filme lipídico no sistema capilar

O filme lipídico formado no interior do tubo capilar durante o processo de secagem foi visualizado através de microscopia eletrônica de varredura (item 4.5.10), sendo estas apresentadas na Figura 54.

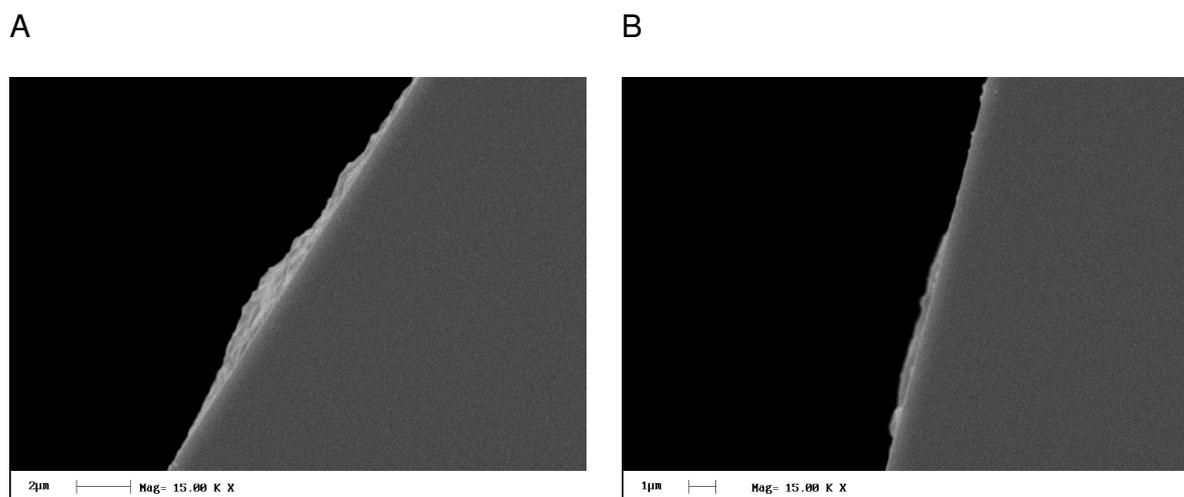


Figura 54: Micrografia obtida a partir de microscopia eletrônica de varredura do tubo capilar para identificação do filme lipídico seco, utilizando uma concentração de lipídios totais de 50 mM na fase alcoólica. As barras referem-se à 2 (A) e $1 \mu\text{m}$ (B).

Na Figura 54 nota-se que o filme lipídico apresenta grande variação de espessura ao longo do diâmetro interno e, conseqüentemente, da altura do capilar. Várias medidas da espessura foram realizadas para as várias micrografias, possibilitando a construção de um histograma com a distribuição das

espessuras, conforme apresentado na Figura 55 e a estimativa do valor médios em $0,47 \pm 0,29 \mu\text{m}$.

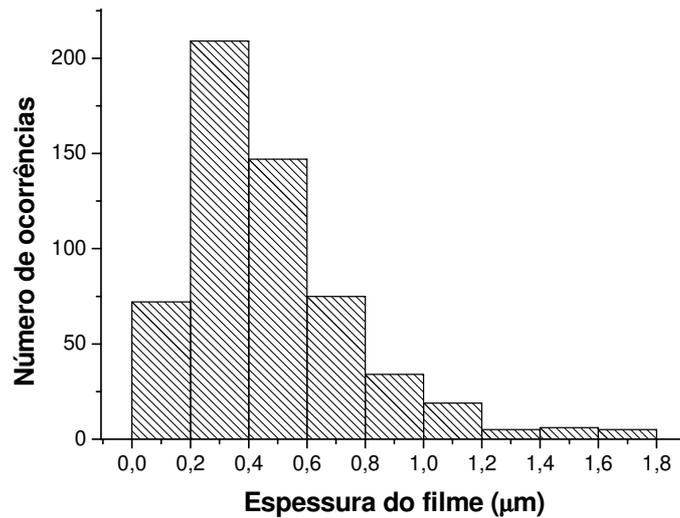


Figura 55: Histograma da distribuição das espessuras de filme lipídico seco, utilizando uma concentração de lipídios totais de 50 mM na fase alcoólica.

5.5.4. Simulação matemática da produção mássica de lipossomas

A simulação da produção mássica de lipossomas foi desenvolvida tendo como base o trabalho de Carneiro, 2004, que utilizou o conjunto de equações apresentadas no item 4.6 e aplicou o método de Euler para integração das equações diferenciais para criar uma rotina de cálculo utilizando o software Excel 2000 for Windows da Microsoft Corporation para a determinação dos perfis de formação de lipossomas (massa de lipídio) com o tempo.

As propriedades físico-químicas da solução aquosa (água) utilizada para a hidratação do filme lipídico, que possibilitou a formação dos lipossomas, além das dimensões do tubo de vidro utilizado para a adsorção dos lipídios e da respectiva área superficial interna estão apresentadas no Quadro 1. A densidade do sólido foi calculada a partir da área superficial interna do capilar, espessura do filme

lipídico seco (item 5.5.4) e da massa total adsorvida no sistema capilar para concentração lipídica total de 50 mM estimada no item 5.5.3, também é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Propriedades físico-químicas da fase aquosa e sólida e dimensões do capilar de vidro utilizados para a modelagem

<p><u>Dimensões do tubo capilar de vidro:</u> Diâmetro interno: 1,6 mm (0,16 cm) Altura: 11,5 cm Área superficial interna (S_0): 5,78 cm²</p> <p><u>Fase Aquosa:</u> Viscosidade (η): 0,01 g/cm.s (i) Tensão superficial (σ): 72,8 g/s² (i)</p> <p><u>Fase Sólida:</u> Densidade (ρ): 6,82 g/cm³ (ii) Ângulo de contato (θ): 91,2 ± 3,6 ° (iii)</p>

(i) Valores obtidos a partir de Perry, 1997 onde a temperatura de referência é 25°C.

(ii) Densidade estimada a partir da área superficial interna do capilar, espessura do filme lipídico seco (item 5.5.4) e da massa total adsorvida no sistema capilar para a concentração lipídica total de 50 mM (item 5.5.3).

(iii) Considerado similar ao ângulo de contato da pele, formada por uma camada externa de lipídeos (Elkhyat et al., 2004 e Sheu et al., 1999).

5.5.4.1. Determinação dos parâmetros K_t e K_t'

A determinação dos parâmetros K_t e K_t' da Equação 20 depende da concentração de vesículas (C_v), sendo esta obtida a partir da correlação entre a concentração total lipídica e a respectiva absorbância a 340 nm (Figura 52).

Para determinar a concentração de vesículas dividiu-se a concentração de fosfolipídios pelo número de agregação N. Este número refere-se ao número total de moléculas de lipídios por lipossoma e pode ser calculado a partir da área superficial total (A_T) que é a soma das superfícies interna e externa da bicamada do lipossoma. Considerando a espessura da bicamada (e) de 4 nm (Lasic, 1997), A_T pode ser calculado usando o diâmetro médio hidrodinâmico (considerando

geometria esférica e distribuição unimodal de tamanhos). A_T também pode ser calculada pela multiplicação do número total de moléculas de lipídios (N) e sua respectiva secção transversal de área (a). Por meio da Equação 23 obtém-se o número total de moléculas de lipídio (Lasic, 1997; Israelachvili & Mitchell, 1975):

$$N = \frac{4\pi \cdot \left(\frac{D_H}{2}\right)^2 + 4\pi \left(\frac{D_H}{2} - e\right)^2}{a_{PL}} \quad \text{Equação 23}$$

Onde,

D_H : diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (corresponde à espessura da bicamada lipídica)

a_{PL} : área média das moléculas de lipídios que compõem o lipossoma.

Neste caso, a_{PL} é dado pela Equação 24, pois relaciona-se à proporção molar dos lipídios presentes no sistema (Lasic, 1997; Israelachvili & Mitchell, 1975):

$$a_{PL} = 0,5 \cdot a_{EPC} + 0,25 \cdot a_{DOPE} + 0,25 \cdot a_{DOTAP} \quad \text{Equação 24}$$

onde,

$$a_{EPC}: 0,71 \text{ nm}^2 \text{ (i)}$$

$$a_{DOPE}: 0,55 \text{ nm}^2 \text{ (i)}$$

$$a_{DOTAP}: 0,7 \text{ nm}^2 \text{ (i)}$$

O diâmetro médio hidrodinâmico, considerado neste caso, é a média ponderada dos diâmetros apresentados na Figura 50, cujo valor é 280,8 nm. Através da Equação 25, a_{PL} é 0,67 nm² e nestas condições, o valor de N para este sistema é 7,2x10⁵.

As curvas das concentrações de vesículas C_v ao longo do tempo foram construídas e estão apresentadas na Figura 56.

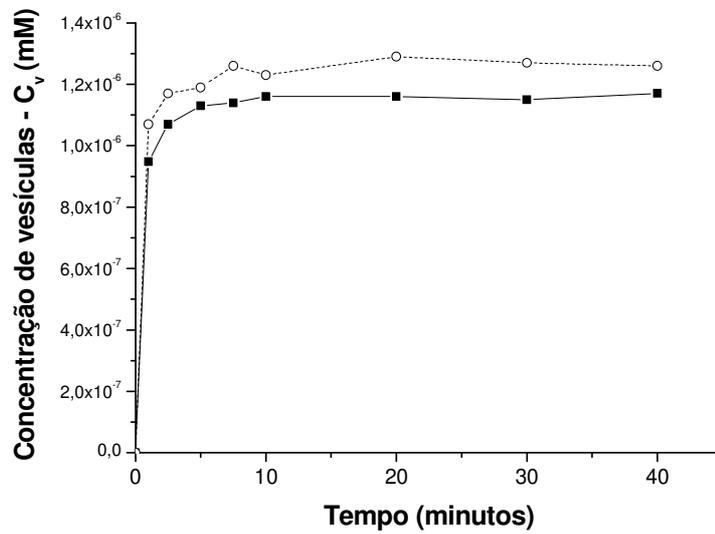


Figura 56: Concentração de vesículas ao longo em função do tempo para as concentrações de 50 (-■-) e 60 (-○-) mM.

A partir das absorbância a 340 nm obtidas durante a etapa de hidratação, pode-se calcular a concentração de vesículas (Figura 56). Desta forma, a partir da Equação 20, torna-se possível a obtenção dos valores de K_t e K_t' através de um gráfico de $1/C_v$ em função de $1/t$, no qual o valor do coeficiente linear é igual a $1/K_t$ e o coeficiente angular é igual a razão entre K_t' e K_t . A Figura 57 apresenta este gráfico para as concentrações totais lipídicas de 50 e 60 mM.

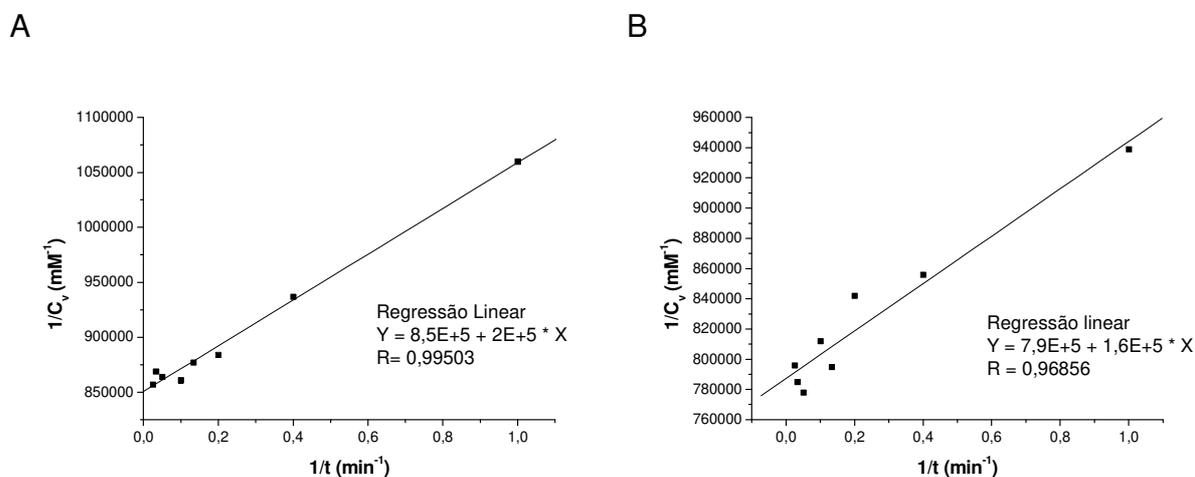


Figura 57: Determinação dos parâmetros da equação da concentração de vesículas em função do tempo a partir das absorvâncias a 340 nm medidas durante a formação dos lipossomas. A) Concentração inicial do total de lipídios 50 mM e B) 60 mM.

A Tabela 14 apresenta os parâmetros K_t e K'_t estimados para as concentrações estudadas.

Tabela 14: Parâmetros K_t e K'_t estimados para as concentrações totais de lipídios de 50 e 60 mM

Concentração total de lipídio na fase alcoólica (mM)	K_t (mM)	K'_t (min)
50	$1,27 \times 10^{-7}$	0,0265
60	$1,27 \times 10^{-6}$	0,1999

5.5.4.2. Determinação do parâmetro K_v

O valor de K_v da Equação 19 foi obtido a partir da taxa inicial de formação de vesículas, ou seja, a partir do valor da derivada da Equação 20 para os tempos iniciais. Derivando-se a Equação 20 temos:

$$\frac{dC_v}{dt} = \frac{K_t \cdot K_t'}{K_t'^2 + 2K_t' t + t^2} \quad \text{Equação 25}$$

Tomando o limite da Equação (25) quando t é muito pequeno ($t \rightarrow 0$) temos que:

$$K_v \cdot C_v = \left. \frac{dC_v}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = \frac{K_t}{K_t'} \quad \text{Equação 26}$$

O valor de C_v a ser considerado na Equação 26 deve corresponder ao tempo inicial de formação dos lipossomas, sendo neste caso considerado o valor de 5% do valor máximo de C_v encontrado na Figura 56.

Uma vez conhecido os valores de K_t e K_t' (obtidos no item anterior) e C_v , pode-se calcular o valor de K_v , sendo apresentado na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetro K_v e K_{ext} estimados para as concentrações totais de lipídios de 50 e 60 mM.

Concentração total de lipídio na fase alcoólica (mM)	K_v (g/(mM.s) x 10^{-3})	K_{ext} (g/(mM.s) x 10^{-8})
50	5,33	1,73
60	7,08	2,30

5.5.4.3. Determinação do parâmetro K_{ext}

O valor de K_{ext} foi obtido a partir dos dados de K_v e C_v , pois sabe-se que nos tempos finais do processo de hidratação não há variação da massa de fosfolípidios no meio com o tempo ($\frac{dm}{dt} = 0$) e todo o filme lipídico já foi penetrado pelo líquido e desintegrado ($L_p - L_d = 0$). Utilizando destas considerações na Equação 19 pode-se obter uma expressão para K_{ext} conforme apresentado na Equação 27:

$$K_{ext} = \frac{K_v C_v}{S_0 \cdot \left(1 - \frac{\epsilon}{\tau}\right)} \quad \text{Equação 27}$$

Assumindo que a porosidade (ϵ), tortuosidade (τ), diâmetro hidráulico dos poros (d_H) e n possuam valores de 0,22, 1,1, 5×10^{-7} nm e 1, respectivamente, pelas características intrínsecas do sistema, os parâmetros K_{int} e a foram ajustados de forma que os dados gerados pelo modelo se aproximassem ao máximo dos dados experimentais. Estes valores estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros ajustados durante a simulação da formação dos lipossomas.

Concentração total de lipídio na fase alcoólica (mM)	K_{int} (g/cm ² s x 10 ⁻⁷) (i)	a (ii)
50	1,62	-0,00035
60	1,83	-0,00035

(i) Coeficiente de transferência de massa interna;

(ii) Parâmetro da Equação 22.

5.5.4.4. Simulação matemática da cinética de formação dos lipossomas e predição da espessura do filme lipídico seco

Através do modelo matemático proposto e das estimativas de parâmetros descritos anteriormente, foi possível simular a massa total de lipídios dissolvida na fase aquosa formadora dos lipossomas em função do tempo, para as duas concentrações estudadas (50 e 60 mM) e confrontá-los com os dados experimentais, conforme apresentado na Figura 58.

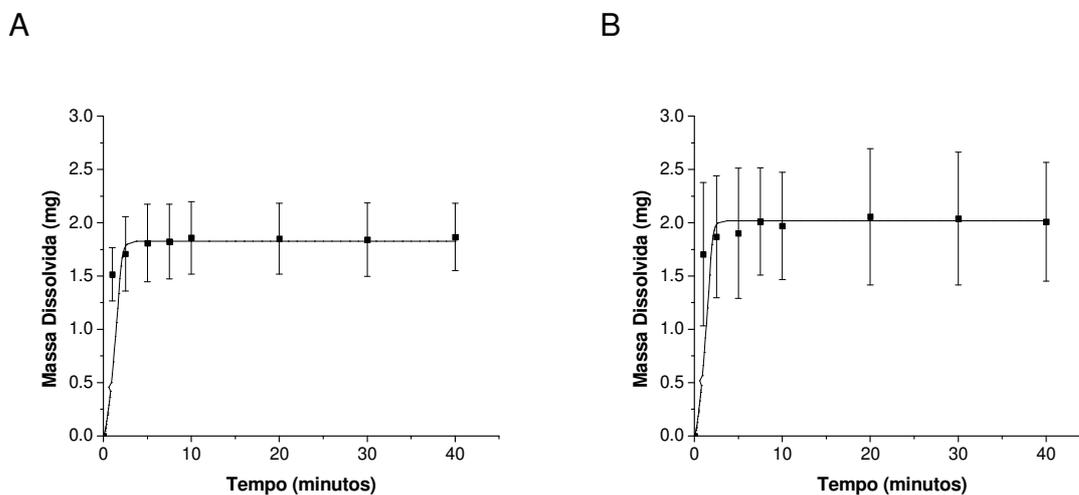


Figura 58: Comparação entre dados experimentais e simulação matemática para a formação dos lipossomas nas duas concentrações totais de lipídios na fase alcoólica de 50 (A) e 60 (B) mM. A linha contínua representa a simulação matemática, enquanto (■) representa os dados experimentais, conforme descrito na Figura 53.

A Figura 58 mostra que o modelo matemático proposto, com seus respectivos parâmetros, ajusta-se adequadamente aos pontos experimentais.

O modelo gerou também informações referentes ao comprimento penetrado e ao dissolvido em função do tempo para as duas concentrações estudadas, que são mostradas na Figura 59.

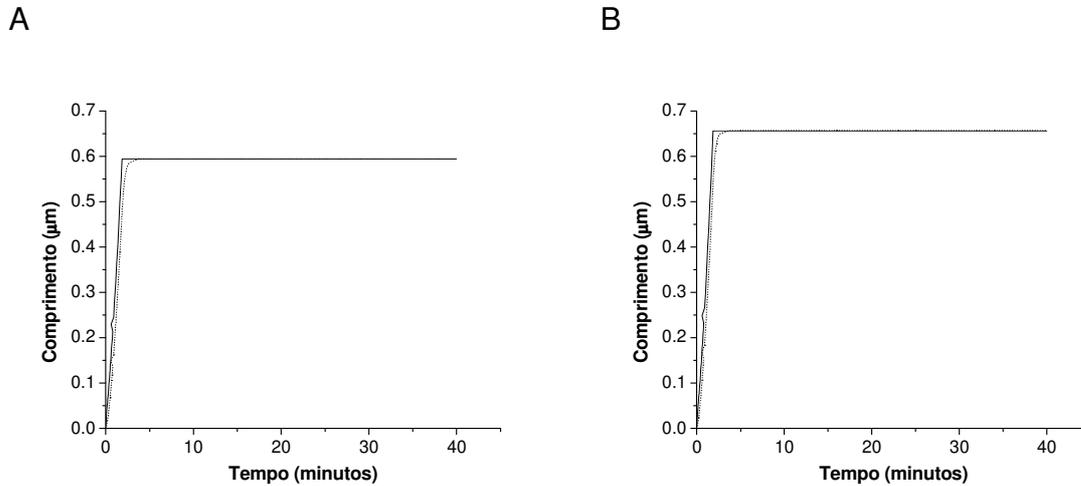


Figura 59: Variação do comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido (L_p , —) e do comprimento do filme lipídico dissolvido (L_d , ----) com o tempo, para as concentrações lipídicas totais em fase alcoólica de 50 (A) e 60 (B) mM.

A Figura 59 mostra que os valores de L_p e L_d são muito próximos, o que indica que a dissolução do filme lipídico ocorre tão logo o filme é penetrado pela solução aquosa, não havendo um comprimento molhado significativo. Esta característica pode estar associada à facilidade de hidratação dos lipídios, uma vez que todos possuem temperatura de transição de fases abaixo da temperatura ambiente.

O modelo permitiu, também, estimar a espessura do filme lipídico adsorvido na superfície dos tubos de vidro. Esse valor corresponde ao valor máximo atingido por L_p e L_d na simulação (Figura 59) e pode ser comparado à espessura medida experimentalmente no item 5.5.4. A Tabela 17 apresenta os valores obtidos para a espessura do filme lipídico seco para cada uma das concentrações estudadas.

Tabela 17: Espessura do filme lipídico seco obtido pela modelagem da cinética de formação dos lipossomas para cada uma das concentrações estudadas.

Concentração total de lipídio na fase alcoólica (mM)	Espessura do filme lipídico (μm)
50	0,59
60	0,65

Os valores obtidos para a espessura dos filmes lipídicos são coerentes com a medida experimental (item 5.5.4), a qual identificou a espessura no valor de em $0,47 \pm 0,29 \mu\text{m}$ para a concentração inicial de lipídios na fase alcoólica em 50 mM. A comparação dos valores da Tabela 17 com o valor experimental mostra a adequação do modelo, pois os valores estão na mesma ordem de grandeza e dentro das variações das medidas experimentais.

A Tabela 17 também revela que a elevação da concentração lipídica de 50 para 60 mM ocorre a formação do filme lipídico seco de espessura maior, o que é de se esperar uma vez que a quantidade de lipídio no sistema é maior.

6. CONCLUSÕES

A partir dos estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina gênica veiculada em adjuvantes lipídicos para a tuberculose, tem-se as seguintes conclusões:

Avaliação da estrutura lipídica mais promissora:

- O processo de desidratação-rehidratação e complexação eletrostática com lipídios catiônicos não causa prejuízo ao plasmídeo, garantindo sua funcionalidade.
- A caracterização pelos vários métodos, das estruturas preparadas na razão de cargas $R_{+/-}$ 10, utilizada para testes *in vivo* e *in vitro*, assegurou que o DNA está completamente incorporado, garantindo a natureza catiônica final.
- DRV(DNA)s são estruturas mais organizadas e mais compactas, onde o DNA está distribuído uniformemente de modo a não perturbar significativamente a bicamada lipídica, sugerindo que há incorporação do plasmídeo na estrutura lipídica.
- DRV-DNA é uma estrutura maior que o DRV(DNA), apresenta o DNA na região mais externa (próxima à superfície) causando pequenas modificações nas bicamadas lipídicas.
- Lipoplexos são bastante desorganizados, justificando o polimorfismo e heterogeneidade de tamanhos.
- Os primeiros ensaios biológicos revelaram que os lipoplexos apresentaram citotoxicidade elevada e foram descartados.
- A rota de administração nasal apresentou melhores resultados para as estruturas DRV-DNA, sendo esta escolhida como a mais promissora e viabilizando uma vacina de dose única contra a tuberculose.

Considerações de processo:

- As etapas de processamento das estruturas vazias do tipo DRV puderam ser simplificadas com a eliminação da extrusão e a possibilidade de estocagem na forma liofilizada por períodos de até um ano.

Inclusão de peptídeo com sinal de direcionamento nuclear nas estruturas DRV-DNA:

- A inclusão do peptídeo com sinal direcionador ao núcleo celular não alterou o diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos e a assecibilidade à sonda de fluorescência, porém alterou significativamente a densidade de cargas e a morfologia das estruturas, quando comparada ao DRV-DNA.

Análise do escalonamento da produção de lipossomas:

- Os lipossomas produzidos pelo sistema de adsorção em tubo capilar apresentou características físico-químicas semelhantes aos lipossomas produzidos pelo método de Bangham. O diâmetro hidrodinâmico apresentou-se menor, possivelmente pela característica de escoamento diferente na hidratação quando comparado à unidade laboratorial.
- A simulação da cinética de produção mássica dos lipossomas apresentou-se coerente com os tempos finais de hidratação. Para os tempos iniciais o modelo não se ajustou devido às considerações realizadas para a determinação das concentrações.
- O cálculo da espessura do filme lipídico seco no modelo proposto apresentou-se coerente ao encontrado experimentalmente.

De modo geral, pode-se concluir que os sistemas lipídicos, mais especificamente lipossomas catiônicos produzidos pelo método DRV quando complexados com DNA apresentam-se promissores como adjuvantes na veiculação de DNA como vacina gênica.

Mais especificamente, lipossomas do tipo DRV (dehydrated-hydrated vesicles) complexados eletrostaticamente com DNA viabilizaram a imunização efetiva de camundongos em dose única. Esta característica permite que estudos sejam continuados com testes clínicos visando aplicação em humanos para a consolidação desta tecnologia como um novo produto para a vacinação de indivíduos contra a tuberculose.

A estratégia de inclusão de peptídeo com sinal de direcionamento nuclear é factível, tornando-se uma alternativa para estudos para a avaliação da eficiência da vacina, como forma de otimização do produto.

Além disso, a ampliação de escala da produção de lipossomas (precursores dos DRVs) é viável, podendo ser utilizada como tecnologia para fornecimento de lipossomas para a continuação de testes futuros tanto em animais como em humanos.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Para a continuação das pesquisas no âmbito da otimização da vacina e na ampliação de escala, as seguintes sugestões podem ser citadas para trabalhos futuros :

- Avaliação *in vivo* da estrutura DRV-DNA-peptídeo para otimização da quantidade de peptídeo a ser incorporada, uma vez que não existe na literatura quantidades para estes ensaios *in vivo*.
- Avaliação de outros peptídeos sintéticos com característica de direcionamento nuclear nas estruturas DRV-DNA, uma vez que diferentes tipos de peptídeos podem ter diferentes efeitos *in vivo*.
- Estudar a condensação do complexo binário DNA-peptídeo em termos de se retirar a ciclização (ponte de dissulfeto) do peptídeo;
- Avaliação *in vivo* do complexo ternário DRV-DNA-peptídeo;
- Avaliar outra metodologia de complexação entre DRV, DNA e peptídeo (complexação simultânea) em aspectos físico-químicos e efeitos *in vivo*.
- Outros tipos de lipídios catiônicos também podem ser avaliados quanto à característica físico-química e efeitos biológicos;
- Estabelecer metodologia para a quantificação dos lipídios para que o modelo da cinética de formação dos lipossomas possa ser validado nos tempos iniciais com dados experimentais.
- A tecnologia para adsorção pode ser otimizada incluindo recheios com esferas de vidro no tubo capilar para maximizar a área de adsorção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMICH, M.; BACH, D.T. Method for manufacturing liposomes. **United States Patent**, n. 4.622.188, 1986.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 3. ed., New York:Garland Publisher, 1994.
- ALMOFTI, M.R.; HARASHIMA, H.; SHINOHARA, Y.; ALMOFTI, A.; BABA, Y.; KIWADA, H. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 246–253, 2003.
- BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238, 1965.
- BANKS, G.A.; ROSELLI, R.J.; CHEN, R.; GIORGIO, T.D. A model for the analysis of nonviral gene therapy; **Gene Therapy**, v. 10, p. 1766-1775, 2003.
- BARENHOLZ, Y.; LASIC, D. **Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes Volume III**; CRC Press, Boca Raton, 1996.
- BASTOS, R.; PANTE, N.; BURKE, B. Nuclear pore complex proteins. **International Review of Cytology**, v. 162B, p. 257-302, 1995.
- BENAMEUR, H.; MOES, A. Liposomes preparation method and plant. **United States Patent**, n. 6.217.899, 2001.
- BENNETT, C.F.; CHIANG, M.-Y.; CHAN, H.; SHOEMAKER, J.E.; MIRABELLI, C.K. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotide. **Molecular Pharmacology**, v. 41, p. 1023-1033, 1992.
- BLOOMFIELD, V. A. Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. **Biopolymers**, v.31, p. 1471-1481, 1991.
- BORDI, F.; CAMETTI, C.; GILI, T.; GAUDINO, D.; SENNATO, S. Time evolution of different size cationic liposome-polyelectrolyte complexes. **Bioelectrochemistry**, v. 59, p. 99-106, 2003.
- BORSANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 1v. 254p.
- BRACKEN, K.R. Method for vesicle formation. **United States Patent**, n. 4.935.171, 1990.
- BYRNES, C.K.; NASS, P.H.; DUNCAN, M.D.; HARMON, J.W., A nuclear targeting peptide, M9, improves transfection efficiency in fibroblasts; **Journal of Surgical Research**, v. 108, p. 85-90, 2002.
- CARNEIRO, A.L. **Projeto, montagem e operação de instalação para produção escalonável de lipossomas visando aplicações farmacêuticas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CARNEIRO, A.L.; SANTANA, M.H.A. Production of liposomes in a multitubular system useful for scaling-up of processes. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 108, p. 273, 2004.
- CHAN, C.K.; JANS, D.A. Enhancement of polylysine-mediated transfection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. **Human Gene Therapy**, v. 10, p. 1695-1702, 1999.
- CHAN, C.K.; JANS, D.A. Enhancement of MSH receptor- and GAL4-mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway. **Gene Therapy**, v.8, p.166-171, 2001.
- CHESNOY, S.; HUANG, L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 27-47, 2000.
- CHIN, D.J.; GREEN, G.A.; ZON, G.; SZOKA Jr., F.C.; STRAUBINGER, R.M. Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. **New Biology**, v. 2, p. 1091-1100, 1990.

- COLLAS, P.; HUSEBYE, H.; ALESTRON, P. The nuclear localization sequence of the SV 40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. **Transgenic Research**, v. 5, p. 451-458, 1996.
- COLLINS, D. Liposome preparation and material encapsulation method. **United States Patent**, n. 6.355.267, 2002.
- CORDES, V.C.; REIDENBACH, S.; RACKWITZ, H.R.; FRANKE, W.W. Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex attached intranuclear filaments. **Journal of Cell Biology**, v. 136, p. 515-529, 1997.
- CROMMELIN, D.J.A.; SCHEREIER, H. Liposomes. In: Kreuter, J. **Colloidal Drug Delivery Systems**. Nova Iorque: Marcek Dekker, Inc., 1994. v. 66, p. 73-190.
- CROOK, K.; STEVENSON, B.J.; DUBOUCHET, M.; PORTEUS, D.J. Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells *in vitro* in the presence of serum. **Gene Therapy**, v. 5 p. 137-143, 1998.
- CROWE, L.M.; CROWE, J.H.; RUDOLPH, A.; WOMERSLEY, C.; APPEL, L. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 242, p. 240-247, 1985.
- DAIGLE, N.; BEAUDOUIN, J.; HARTNELL, L.; IMREH, G.; HALLBERG, E.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ELLENBERG, J. Nuclear pore complexes from immobile networks have a very low turn over in live mammalian cells. **Journal of Cell Biology**. v. 154, p.71-84, 2001.
- DEAN, D.A. Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 44, p. 81-95, 2000.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DESHMUH, H.M.; HUANG, L. Liposome and polylysine mediated gene transfer. **New Journal of Chemistry**, v. 21, p. 113-124, 1997.
- DUZGUNES, N.; GOLDSTEIN, J.A.; FRIEND, D.S.; FELGNER, P.L. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N[2,3-(dioleoyl-oxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v. 28, p. 9179-9184, 1989.
- DORAN, P.M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic press, 1997
- EASTMAN, S.J.; SIEGEL, C.; TOUSIGNANT, J.; SMITH, A.E.; CHENG, S.H.; SCHEULE, R.K. Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1325, p. 41-62, 1997.
- ELKHAYAT, A.; COURDEROT-MASUYER, C.; GHARBI, T.; HUMBERT, P. Influence of the hydrophobic and hydrophilic characteristics of sliding and slider surfaces on friction coefficient: *in vivo* human skin friction comparison. **Skin Research and Technology**, v. 10, p. 215-221, 2004.
- ESPOSITO, E.; SEBBEN, S.; CORTESI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Preparation and characterization of cationic microspheres for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.189, p. 29-41, 1999.
- FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1235, p.289-295, 1995.
- FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAM, H.W.; WENZ, M.; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 7413-7417, 1987.
- FELGNER, J.H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C.N.; WHEELER, C.J.; TSAI, Y.J.; BORDER, R.; MARTIN, M.; FELGNER, P.L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel

- series of cationic formulations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 2550-2561, 1994.
- FERRARI, M.E.; RUSALOV, D.; ENAS, J.; WHEELER, C.J.; Trends in lipoplex physical properties dependent on cationic lipid structure, vehicle and complexation procedure do not correlate with biological activity. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p.1539-1548, 2001.
- FILION, M.C.; PHILLIPS, N. C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1329, p. 345–356, 1997.
- FINE, P.E.M. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, p. S353-S359, 1989.
- FRITZ, J.D.; HERWEIJER, H.; ZHANG, G.; WOLFF, J.A. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. **Human Gene Therapy**, v. 7, p. 1395–1404, 1996.
- GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. **Gene Therapy**, v. 2, p. 710-722, 1995.
- GAO, X.; HUANG, L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. **Biochemistry**, v. 35, p. 1027-1036, 1996
- GERSHON, H.; GHIRLANDO, R.; GUTTMAN, S.B.; MINSKY, A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection **Biochemistry**, v. 32, p. 7143–7151, 1993.
- GOLDBERG, M.W.; ALLEN, T.D. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 257, p. 848-865, 1996.
- GREGORIADIS, G.; SAFFIE, R.; HART, S.L. High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: effect on DNA integrity and transfection. **Journal of Drug Targeting**, v. 3, p. 469-475, 1996.
- GREGORIADIS, G.; SAFFIE, R.; DE SOUZA, B. Liposome-mediated DNA vaccination. **FEBS Letters**, v. 402, p. 107-110, 1997.
- GREGORIADIS, G.; MCCORMACK, B.; OBRENOVIC, M.; PERRIE, Y. Entrapment of plasmid DNA vaccines into liposomes by dehydration/rehydration. In: Lowrie D.B.; Whalen, R. **Methods in Molecular Medicine, DNA Vaccines: Methods and Protocols**. Totowa, N.J.:Humana Press, 1999. v. 9, p.305-312.
- GREGORIADIS, G.; MCCORMACK, B.; OBRENOVIC, M.; SAFFIE R.; ZADI, B.; PERRIE, Y. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. **Methods**, v. 19, p. 156-162, 1999.
- GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**; CRC Press, Boca Raton, 1993.
- GUSTAFSSON, J.; ARVIDSON, G.; KARLSSON, G.; ALMGREN, M. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1235, p. 305-312, 1995.
- HAWLEY-NELSON, P.; LAN, J.; SHIH, P.; JESSEE, J.A.; SCHIFFERLI, K.P.; GEBEYEHU, G.; CICCARONE, V.C.; EVANS, K.L. Peptide-enhanced transfections. United States Patent n. 20030144230, 2003.
- HABERLAND, A.; KNAUS, T.; ZAITSEV, S.V.; STAHN, R.; MISTRY, A.R.; OUTELLE, C., HALLER, H., BOTTGEER, M. Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1445, p. 21-30, 1999.
- HENDERSON, B.R.; PERCIPALLE, P. Interactions between HIV rev and nuclear import and export factors: the rev nuclear localization signal mediates specific binding to human importin β . **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 693-707, 1997.

- HIRSCH-LERNER D.; BARENHOLZ, Y. Probing DNA–cationic lipid interactions with the fluorophore trimethylammonium diphenylhexatriene TMADPH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1370, p. 17–30, 1998.
- HUANG, C.-H.; LI, S. Calorimetric and molecular mechanisc studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1422, p. 273-307, 1999.
- ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J. M. A model for the packing of lipids in bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.389, p. 13-19, 1975.
- KALDERON, D.; ROBERTS, W.D.; RICHARDSON, W.D.; SMITH, A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, v. 39, p.499-509, 1984.
- KALDERON, D.; RICHARDSON, W.D.; MARKHAM, A.F.; SMITH, A.E. Sequence requirements for nuclear location of Simian virus 40 large-T antigen. **Nature**, v. 311, p. 33-38, 1984.
- KIKUCHI, I. S.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Interactions between DNA and synthetic cationic liposomes. **Journal of Physical Chemistry B**, v.104, p.2829-2835, 2000.
- KIKUCHI, I. S.; VIVIANI, W. ; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Nucleotide Insertion in Cationic Bilayers. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, p. 8050-8055, 1999.
- KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydratation-rehydratation vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, p. 979-984, 1984.
- KÖIV, A.; MUSTONEN, P.; KINNUNEN, P.K.J. Differential scanning calorimetry study on the binding of nucleic acids to dimyristoylphosphatidylcoline-sphingosine liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 70, p. 1-10, 1994.
- KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; RADLER, J.O.; SAFINYA, C.R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science**, v. 281, p. 78-81, 1998.
- LABAT-MOLEUR, F.; STEFFAN, A.M.; BRISSON, C.; PERRON, H.; FEGEAS, O. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. **Gene Therapy**, v. 3, p. 1010-1017, 1996.
- LAM, A.M.I.; CULLIS, P.R. Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposomes complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1463, p. 279-290, 2000.
- LANGE, I.; SCHOLZ, M.; PETERS, R.F. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux hepatoma cells. **Journal of Cell Biology**, v. 102, p. 1183-1190, 1986
- LASIC, D.D. **Liposomes: From Physics to Applications**. Amsterdam:Elsevier Science Publishers B.V., 1993. 575 p.
- LASIC, D.D. **Liposomes in Gene Delivery**. Boca Raton-Florida:CRC Press, 1997. 295 p.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, L.D.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2 ed Worth Publishers:New York, 1993. 1152 p.
- LI, S.; WU, S.P.; WHITMORE, M.; LOEFFERT, E.J.; WANG, L. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipid vectors. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. L796-L804, 1999.
- LI, S.; TSENG, W.C.; STOLZ, D.B.; WU, S.P.; WATKINS, S.C. Dynamic changes in the charateristics of cationic lipid vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. **Gene Therapy**, v. 6, p. 585-594, 1999.
- LITZINGER, D.C.; HUANG, L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1113, p. 201-227, 1992.
- LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCAN, R.E. DNA vaccines against tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, p. 591-594, 1997.

- LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCONE, R.E. Genetic vaccination against tuberculosis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 19, p. 161-173, 1997.
- LOWRIE, D.B.; TASCONE, R.E.; BONATO, V.D.L.; LIMA, V.M.F.; FAGGIOLI, L.H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M.J.; HEWINSON, R.G.; MOELLING, K.; SILVA, C.L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v. 400, p. 269-271, 1999.
- LUDKE, J.J.; ZHANG, G.; SEBESTYEN, M.G.; WOLFF, J.A. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2033-2041, 1999.
- MABREY-GAUD, S. in: C.G. Knight (Ed.), **Liposomes: from Physical Structure to Therapeutic Applications**. Amsterdam:Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981, p.105-138.
- MABREY, S.; STURTEVANT, J.M. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 73, p. 3862-3866, 1976.
- MCKENZIE, D.L.; SMILEY, E.; KWOK, K.Y.; RICE, K.G. Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. **Bioconjugate Chemistry**, v. 11, p. 901-909, 2000.
- MILLER, A.D. Cationic liposomes for gene therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 1768-1785, 1998.
- MORTHA, G., MASSON, N., DEPERRAZ, P. **Pharmaceutical Technology Conference**, p. 264-285, 1993.
- MULLIGAN, R.C.; HOWARD, B.H.; BERG, P. Synthesis of rabbit beta-globulin in cultures monkey kidney cells following injection with an SV40 beta-globulin recombinant genome. **Nature**, v. 277, p. 108-114, 1979.
- MUNKONGE, F.M.; DEAN, A.D.; HILLERY, E.; GRIESENBACH, U.; ALTON, E.W.F.W. Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 749-760, 2003.
- NANTES I.L.; CORREIA, F.M.; FALJONI-ALARIO, A.; KAWANAMI, A.E.; ISHIKI, H. M.; -DO AMARAL, A.T.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Nucleotide conformational change induced by cationic bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, p. 25-30, 2003.
- NAKIELNY, S.; MIKKIO, S.C.; HARUHIKO, S.; MICHAEL, W.M.; POLLARD, V.; DREYFUSS, G. Transportin: nuclear import receptor of a novel nuclear protein import pathway. **Experimental Cell Research**, v. 229, p. 261-266, 1996.
- NEW, R.R.C. **Liposomes, a Practical Approach**. 2.ed. Oxford, IRL Press, 1990.
- PANTE, N.; KANN, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameter of ~39 nm. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p.425-434, 2002.
- PATEL, M.; VIVIEN, E.; HAUCHECORNE, M.; OUDRHIRI, N.; RAMASAWMY, R.; VIGNERON, J.P.; LEHN, P.; LEHN, J.M. Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, p. 536-543, 2001.
- PERKINS, W.R.; DAUSE, R.B.; PARENTE, R.A.; MINCHEY, S.R.; NEUMAN, K.C.; GRUNER, S.M.; TARASCHI, T.F.; JANOFF, A.S. Role of lipid polymorphism in pulmonary surfactant. **Science**, 273, p. 330-332, 1996.
- PERRIE, Y.; GREGORIADIS, G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, p. 125-132, 2000.
- PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. **Vaccine**, v. 19, p. 3301-3310, 2001.
- PERRY, J.H. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 7 ed. New York, McGraw-Hill, 1997.
- PRASAD, T. K.; GOPAL V. N.; RAO M.A. Structural changes in DNA mediated by cationic lipids alter in vitro transcriptional activity at low charge ratios. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1619, p. 59-69, 2003.

- PUPO, E.; PADRO'N, A.; SANTANA, E.; SOTOLONGO, J.; QUINTANA, D.; DUEÑAS, S.; DUARTE, C.; ROSA, M. C.; HARDY, E. Preparation of plasmid DNA-containing liposomes using a high-pressure homogenization–extrusion technique. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 379–396, 2005.
- RÄDLER, J.O.; KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**, v. 275, p. 810-814, 1997.
- RÄDLER, J.O.; KOLTOVER, I.; JAMIELSON, A.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R. Structure and interfacial aspects of self-assembled cationic lipid-DNA gene carrier complexes. **Langmuir**, v.14, p. 4272-4283, 1998.
- REGELIN, A.E.; FRANKHAENEL, S.; GURTESCH, L.; PRINS, C.; KIEDROWSKI, G.; MASSING, U. Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1464, p. 151-164, 2000.
- ROBINS, J.; DILWORTH, S.M.; LASKEY, R.A.; DINGWALL, C. Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. **Cell**, v.64, p. 615-623, 1991.
- ROPERT, C. Liposomes as a gene delivery system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 163-169, 1999.
- ROSADA, R.S. “**Vacina de DNA pVAX-Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração**” Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, 2006.
- ROSENFELD, M.A.; SEIGFRIED, W.; YOSHIMURA, K.; YONEYAMA, K.; FUKAYAMA, M.; STIER L.E.; PAAKKO, P.K.; GILARD, P.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.D.; PERRICAUDET, M.; JALLAT, S.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; CRYSTAL, R.G. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1 antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. **Science**, v. 252, p. 431-434, 1991.
- SHEU, H.M.; CHAO, S.C.; WONG, T.W.; LEE, J. Y.Y.; TSAI, J.C. Human skin surface lipid flim: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum. **British Journal of Dermatology**, v. 140, p. 385-391, 1999.
- SILVA, C.L. New vaccines against tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 843-851, 1995.
- SILVA, C.L. Imunizações gênicas. **Imunizações**, v 2, p. 123-129, 1998.
- SILVA, C.L.; LIMA, K.M. Vacinas gênicas. **Médicos**, v. 6, p. 32-41, 1999.
- SILVA, C.L. Terapia gênica. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 4-8, 2000.
- SILVA, C.L. Vacinas gênicas. **Biotecnologia - Ciência e Desenvolvimento**, v 3, p. 32-34, 2000.
- SIMEONI, F.; MORRIS, M.C.; HEITZ, F.; DIVITA, G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery of siRNA into mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 2717-2724, 2003.
- SINGER, V.L.; JONES, L.J.; YUE, S.T.; HAUGLAND, R.P. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. **Analytical Biochemistry**, v. 249, p. 228-238, 1997.
- SIOMI, H.; DREYFUSS, G.A. Nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. **Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 551-560, 1995.
- ŠMISTEROVÁ, J.; WAGENAAR, A.; STUART, M.C.A., POLUSHKIN, E.; BRINKE, G.; HULST R.; ENGBERTS, J.B.F.N.; HOEKSTRA, D. Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the

- efficiency of gene delivery, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47615–47622, 2001.
- SZOKA, F.J.; PAPAHAJDOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), **Annual Reviews on Biophysics and Bioengineering**, v. 9, p. 467-508, 1980.
- STERNBERG, B.; SORGI, F.L.; HUANG, L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. **FEBS Letters**, v. 356, p. 361-366, 1994.
- SUBRAMANIAN, A.; DIAMOND, S.L. Enhancement of nonviral gene transfer to endothelial cells using lipofection of histone complexed DNA. **Tissue Engineering**, v. 3, p. 39, 1997.
- SUBRAMANIAN, A.; RANGANATHAN, P.; DIAMOND, S.L. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of non dividing mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v.17, p. 873-877, 1999.
- SUBRAMANIAN, M.; HOLOPAINEN, J. M.; PAUKKU, T.; ERIKSSON, O.; HUHTANIEM, I.; KINNUNEN, P. K.J. Characterisation of three novel cationic lipids as liposomal complexes with DNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1466, p. 289-305, 2000.
- TAGAWA, T.; MANVELL, M.; BROWN, N.; KELLER, M.; PEROUZEL, E.; MURRAY, K. D.; HARBOTTLE, R. P.; TECLE, M.; BOOY, F.; BRAHIMI-HORN, M.C.; COUTELLE, C.; LEMOINE, N.R.; ALTON, E. W. F. W.; MILLER, A. D. Characterisation of LMD virus-like nanoparticles self-assembled from cationic liposomes, adenovirus core peptide μ and plasmid DNA. **Gene Therapy**, v. 9, p. 564-576, 2002.
- TAYLOR, J.R. An introduction to error analysis – The study of uncertainties in physical measurements. California: University Science Books, 1997, 327p.
- TEMIN, H.M. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. **Human Gene Therapy**, v. 1, p. 111-123, 1990.
- THOMAS, T.; THOMAS, T.J. Polyamines in cell grow and cell death: molecular mechanism and therapeutics application. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 58, p.244-258, 2001.
- TOKUNAGA, M.; HAZEMOTO, N.; TOTSUYANAGI, T. Effect of oligopeptides on gene expression: comparison of DNA/peptide and DNA/peptide/ liposome complexes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 71-80, 2004.
- TOMLINSON, E.; ROLLAND, A.P. Controllable gene therapy: pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 39, p. 357-372, 1996.
- TOURNIER, H.; SCHNEIDER, M.; GUILLOT, C. **Liposomes with enhanced entrapment capacity and their use in imaging**. United States Patent n. 5.980.937, 1999.
- TSENG, W.C.; HASELTON, F.R.; GIORGIO, T.D. Transfection, by cationic liposomes using simultaneous single cell measurement of plasmid delivery and transgene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 25641-25647, 1997
- TSAI, J.T.; FURSTOSS, K.J.; MICHNIK, T.; SLOANE, D.L. Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 36, p. 13-20, 2002.
- TUNG, C-H.; STEIN, S. Preparation and application of peptide oligonucleotide conjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 11, p. 605-618, 2000.
- WASAN, E. K.; HARVIE P.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M. B. A multi-step lipid mixing assay to model structural changes in cationic lipoplexes used for *in vitro* transfection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1461, p. 27-46, 1999.
- WELTY, J.R; WICKS, C.E.; WILSON, R.E. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**, New York : John Wiley & Sons, , 1983. 803p.
- XU, Y.; SZOKA, F.C.J. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. **Biochemistry**, v. 35, p. 5616-5623, 1996.

- YANG, J.P.; HUANG, L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. **Gene Therapy**, v. 4, p. 950-960, 1997.
- YEW, N.S.; WANG, K.X.; PRZYBYLSKA, M.; BAGLEY, R.G.; STEDMAN, M. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:DNA complexes. **Human Gene Therapy**, v. 10, p. 223-234, 1999.
- ZABNER, J.; FASBENDER, A.J.; MONINGER, T.; POELLINGER, K.A.; WELSH, M. Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18997-19007, 1995.
- ZAITSEV, S.V.; HABERLAND, A.; OTTO, A.; VOROBEV, V.I.; HALLER, H.; BOTTGER, M. H1 and HMG17 extracted from calf thymus nuclei are efficient DNA carriers in gene transfer. **Gene Therapy**, v. 4, p. 586-592, 1997.
- ZHOU, X.; HUANG, L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1189, p. 195-203, 1994.
- ZUIDAM, N.J.; BARENHOLZ, Y., Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, p.115-128, 1998.
- WALSH, G.; HEADON, D. **Protein Biotechnology**; Wiley, 1 ed., 1974
- WANG, C-Y.; HUANG, L. Highly efficient DNA delivery mediated by pH-sensitive immunoliposomes. **Biochemistry**, v. 28, p. 9508-9514, 1989.
- WASAN, E.K.; AHKOMG, Q.F.; BALLY, M.B.; HOPE, M.J.;REIMER,D. **Use of temperature to control the size of cationic liposome/plasmid DNA complexes**. US 5965542, outubro de 1999.
- WASHBURN, E.W.; **Physics Reviews**, 17, p. 273-281, 1921.
- WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acid. **Nature**, v. 4356, p. 737-138, 1953.
- WATTIAUX, R.; JADOT, M.; WARNIER-PIRROTTE, M.T.; WATTIAUX-DE CONINCK, S. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. **FEBS Letters**, v. 417, p. 199-202, 1997.
- WELSH, N.; OBERG, C.; HELLERSTROM, C.; WELSH, M. Liposome mediated *in vitro* transfection of pancreatic islet cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 49, p. 1157-1164, 1990.
- WROBEL, I.; COLLINS, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1235, p. 296-304, 1995.

ANEXOS

ANEXO I: Nomenclatura internacional IUPAC para os aminoácidos

Amino Ácido	Código
Glycina	G
Alanina	A
Valina	V
Leucina	L
Isoleucina	I
Prolina	P
Fenilalanina	F
Tirosina	Y
Cisteína	C
Metionina	M
Histidina	H
Lisina	K
Arginina	R
Triptofano	W
Serina	S
Treonina	T
Ácido aspártico	D
Ácido Glutâmico	E
Asparagina	N
Glutamina	Q
Ácido aspértico ou asparagina	B
Ácido glutâmico ou glutamina	Z
Desconhecido	X

(<http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/amino-acids.html>, 2004).

ANEXO II : Vetor de expressão pVAX1

pVAX1 (Figura 60) é um vetor plasmideal de 3 kb projetado para o desenvolvimento de vacinas em humanos de acordo com os requisitos do órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA). pVAX1 é derivado do vetor pcDNA3.1 e possui as principais características descritas a seguir:

- As seqüências que não são necessárias para a replicação em *E. coli* ou para a expressão da proteína recombinante em células de mamíferos foram removidas com o intuito de minimizar a possibilidade de homologia com o genoma humano e integração com o genoma humano.
- O gene responsável pela resistência ao antibiótico ampicilina foi substituído pelo gene que confere resistência à canamicina, pois os antibióticos aminoglicosilados apresentam menor resposta alérgica em humanos.

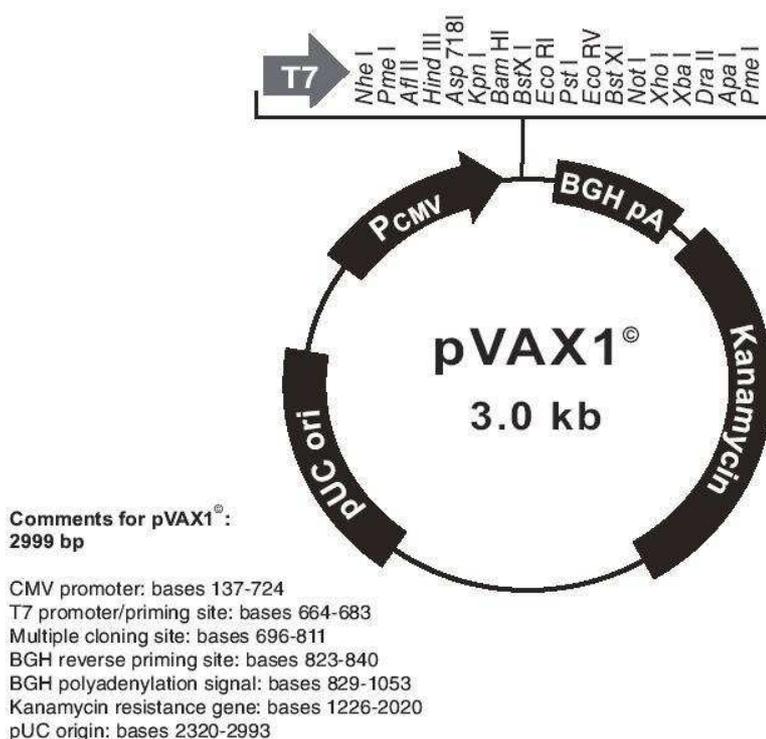


Figura 60: Mapa com informações gerais sobre o vetor pVAX utilizado para vetorizar o segmento de DNA que codifica o antígeno *M.leprae* Hsp65

(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pVAX1_man.pdf, 2004).

ANEXO III : Histórico térmico para DRVs e agregados lipídicos

A investigação do histórico térmico das amostras de DRV vazio e agregado lipídico foi realizada através do emprego de dois processos de aquecimento (faixa de temperatura de -30 a +60°C, com taxa de aquecimento de 10°C/minuto) intercalados por um resfriamento. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18 e nas Figuras 61 e 62. As temperaturas de transição de fases identificadas em cada um dos aquecimentos (Tabela 18) foram consideradas muito próximas. Nestes termogramas, os perfis encontrados no primeiro e no segundo aquecimento foram praticamente iguais, indicando que com relação histórico térmico, o primeiro aquecimento já é suficiente para caracterizar as propriedades térmicas em questão (Figuras 61 e 62).

Tabela 18: Valores de Tm e ΔH utilizados para a investigação do histórico térmico para DRV vazio e agregado lipídico.

Estruturas	Primeiro aquecimento		Segundo aquecimento	
	Temperatura transição de fases	ΔH	Temperatura transição de fases	ΔH
	(oC)	(cal/mol)	(oC)	(cal/mol)
DRV vazio	+15,32	5130	+15,56	5224
Agregados lipídicos	+2,63	4129	+2,61	3721

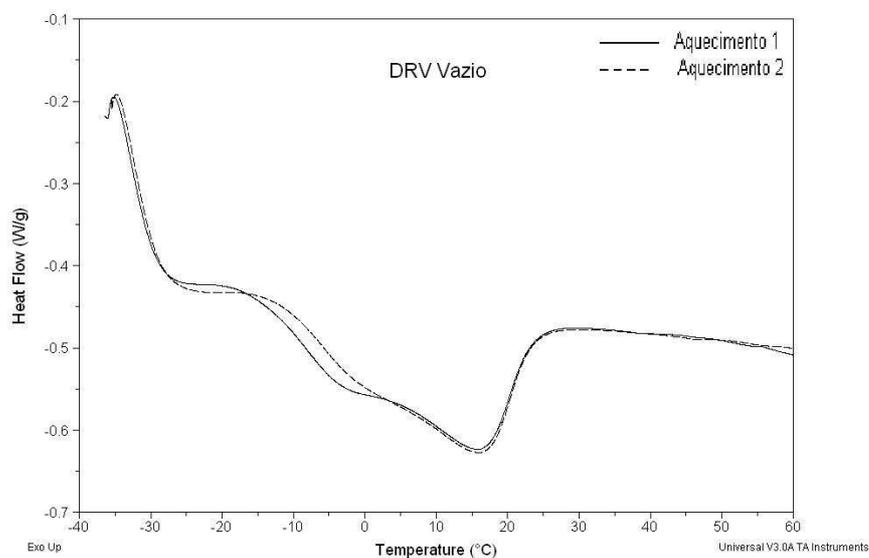


Figura 61: Histórico térmico dos lipossomas vazios preparados pelo método DRV (PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar), na faixa de temperatura -30 a +60°C. Taxa de aquecimento: 10 °C/min.

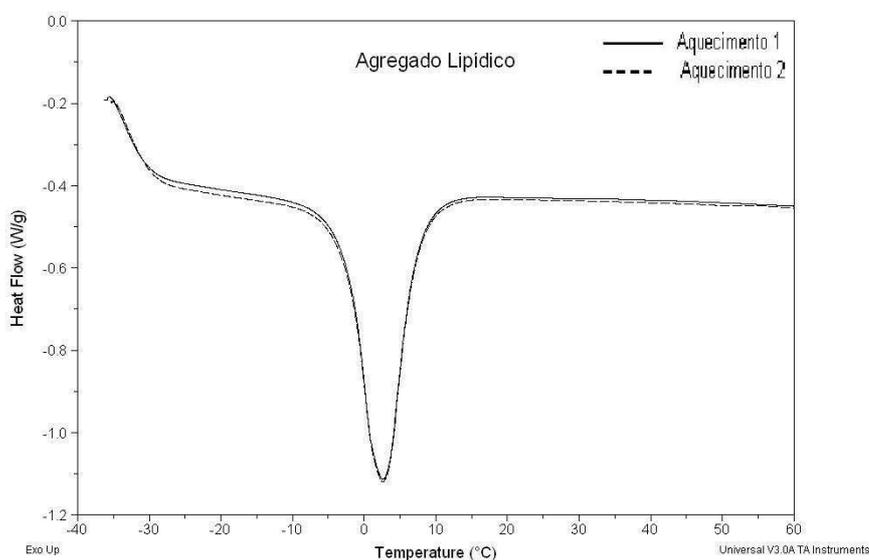


Figura 62: Histórico térmico do agregado lipídico (DOPE/DOTAP 50/50% molar), na faixa de temperatura -30 a +60°C. Taxa de aquecimento: 10 °C/min.

ANEXO IV: Resumo da Dissertação de Mestrado “Vacina de DNA pVAX-Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração” (Fonte: Rogério Silva Rosada, Dissertação de Mestrado, FCM-USP-RP)

RESUMO

As vacinas de DNA têm sido amplamente utilizadas nos últimos 10 anos como uma nova estratégia de vacinação para diferentes patologias. Apesar da eficiente indução da resposta imune em modelos experimentais e, em algumas situações, em humanos, a dose de DNA plasmideal utilizada é relativamente alta. Desse modo, estratégias que visem diminuir a dose administrada com a manutenção da resposta imune têm sido alvo de inúmeras pesquisas. A vacina de DNA-Hsp65 de *Mycobacterium leprae* quando veiculada na dose de 300 µg em DNA plasmideal – pcDNA3-Hsp65- pela via intramuscular tem se mostrado altamente eficiente na profilaxia e terapia contra a tuberculose experimental. Nesse trabalho, avaliamos o papel de outra construção também carreadora do gene da Hsp65 de *M. leprae*, o pVAX-Hsp65, aplicada pela rota intramuscular, utilizando-se o plasmídeo nu na dose de 300 µg ou veiculado em diferentes estruturas lipídicas nas doses de 50 µg ou 100 µg. Avaliamos, ainda, o efeito da administração intranasal de tais estruturas na dose de 25 µg. A administração intramuscular do pVAX-Hsp65 na dose de 300 µg, utilizando-se DNA nu, ou de 50 µg, veiculada em diferentes formulações de lipossomas não induziu proteção contra o posterior desafio com *M. tuberculosis*, apesar de induzir produção de citocinas do perfil T_H1. A vacinação com as formulações induziu principalmente, a produção de anticorpos Hsp65 específicos da subclasse IgG2a, enquanto que o DNA nu induziu a produção tanto de IgG2a quanto IgG1. Quando os animais foram vacinados com duas doses das formulações lipossomais contendo 50 µg, houve uma redução significativa (0,57 log) na unidade formadora de colônia (CFU) de amostras pulmonares, mostrando assim um claro efeito protetor. Inesperadamente, a vacinação pela via intranasal

com apenas 25 µg de DNA carregados em lipossomas conferiu uma proteção muito superior a todas as outras estratégias. Tal fenômeno pode ser evidenciado pela redução de 1,02 log na CFU obtida do pulmão e pela manutenção da arquitetura pulmonar. Esses resultados ressaltam a importância tanto da rota de imunização quanto da dose de DNA empregado nessas vacinas, bem como a forma como é oferecida ao sistema imune para indução de uma imunidade protetora. Além disso, abrem perspectivas para o estudo de novas rotas e formulações para uso de vacinas de DNA contra a tuberculose experimental, com sensível redução na quantidade de DNA plasmídeo utilizado, contribuindo para a biossegurança das mesmas.

ANEXO V: Conclusões da Dissertação de Mestrado “Vacina de DNA pVAX-Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração” (Fonte: Rogério Silva Rosada, Dissertação de Mestrado, FCM-USP-RP)

O modo de oferecer determinada vacina de DNA para o sistema imune pode desencadear diferentes padrões de resposta imune, levando ou não a proteção. Isso fica claro em nossos resultados, e assim concluímos que:

- ✓ O plasmídeo pVAX com o inserto do gene da hsp65 mostrou-se imunogênico exibindo um padrão misto de resposta, tanto para citocinas, quanto para anticorpos.
- ✓ Porém, quando esse plasmídeo foi administrado pela via intramuscular, quer tenha sido injetado em 3 doses nu ou em uma dose veiculada em diferentes lipossomas, não apresentou proteção contra a tuberculose experimental, apesar da produção de citocinas predominantemente de padrão T_H1.
- ✓ Quando este foi veiculado na formulação DRV(DNA) administrado duas vezes pela rota intramuscular, induziu diminuição da CFU e melhora no quadro histopatológico.
- ✓ A administração de uma dose das formulações DRV(DNA) e DRV-DNA veiculando o pVAX Hsp65 pela rota intranasal, conferiu considerável diminuição da CFU e melhora no quadro histopatológico.

ANEXO VI: Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Pesquisa em Tuberculose, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Avaliações (i) *in vitro* envolvendo a detecção da mensagem para hsp65 e estudos de citotoxicidade e (ii) *in vivo* para dosagem de anticorpos estão descritas a seguir.

1. Detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* por RT-PCR

1.1. Transfecção das estruturas lipídicas em células de macrófagos J774

Macrófagos da linhagem J774, em meio RPMI-1640TM incompleto, foram transfectados com pVAX-hsp65 associado às três estruturas de lipídicas [DRV(DNA), DRV-DNA e Lipoplexo], pVAXhsp65 nu e pVAXhsp65 complexado com lipofectina (adjuvante comercial), bem como seus respectivos controles (estruturas lipídicas vazias e contendo apenas o vetor). Dezesesseis a 24 horas após, o meio incompleto foi substituído por RPMI-1640TM completo (10% soro bovino fetal, penicilina 100.000 U/mL e gentamicina 100.000 µg/mL) e a cultura mantida por adicionais 48 horas de incubação a 37°C.

1.2. Obtenção do RNA total após transfecção das estruturas lipídicas em células de macrófagos J774

O sobrenadante foi então descartado e as células aderentes ressuspendidas em 1 mL de TrizolTM. Em seguida as amostras foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, acompanhada da subsequente adição de 200 µL de clorofórmio. O material foi agitado em vórtice por 15 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 4 °C por 15 minutos a 12.000 rpm e a fase aquosa (sobrenadante) cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo. A esse material foram adicionados 500 µL de isopropanol e armazenado em torno de 15 horas a -70 °C. O RNA total foi obtido por centrifugação a 4 °C por 15 minutos a 10.0000 x g e o precipitado ressuspendido em 20-60 µL de água livre de RNase e DNase. A quantificação do RNA total de cada amostra foi realizada no aparelho GeneQuant IITM (Amersham-Pharmacia, BioSciences, USA).

1.3. Síntese da fita de cDNA

O RNA total, obtido conforme descrito no item anterior, foi tratado com a enzima Amplification grade DNase I para completa degradação de DNA, eliminando assim a possibilidade de contaminação com o DNA genômico. Para o tratamento de 1 µg de RNA total adicionou-se 1 µL da enzima Amplification grade DNase I, 1 µL do tampão [20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 2 mM de MgCl₂] e água livre de RNase e DNase, para completar o volume final de 10 µL. A reação foi mantida por 15 minutos a 25°C, e inativada com a adição de 1 µL de EDTA (25mM) seguido de 15 minutos de incubação a 65°C. Para o controle desse processo, 1 µg da amostra foi submetida a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Após o tratamento da amostra com DNase, adicionou-se a enzima SuperScript™ II para a síntese de DNA complementar (cDNA) fita simples. Para cada amostra foi adicionado 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ [500 µg/mL] (Gibco BRL) e 1 µL da mistura de dNTP a 10 mM. A amostra foi mantida por 10 minutos a 70°C e, em seguida, adicionou-se tampão da enzima numa concentração final de 50 mM (Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de DTT). A amostra foi equilibrada por 2 minutos a 42°C e incubada com 1 µL (200 U) de SuperScript™ durante 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada pela incubação por 15 minutos a 70°C.

1.4. Reação de cadeia da polimerase (PCR)

Em seguida, o cDNA obtido foi submetido à reação de PCR. Três microlitros do cDNA (3 µg) fita simples foi utilizado como molde para a amplificação do cDNA específico. Primeiramente, para verificar a qualidade do cDNA obtido, realizou-se o PCR utilizando os *primers* da β-actina, e posteriormente os *primers* da hsp65. Para cada reação (50 µL) adicionou-se 10 mM de cada dNTP, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂,

2,5 unidades da *Taq* DNA polimerase e 10 pmoles de cada *primer*. Os pares de *primers* utilizados para a amplificação da *hsp65* amplificam banda de 400 pares de base. A reação foi incubada em um termociclador PTC-200™ (MJ Research, Inc.) por 3 minutos a 95°C, e em seguida, submetida a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos e uma extensão final de 10 minutos. A amostra obtida foi analisada em eletroforese gel de agarose a 1%. As amostras foram ressuspendidas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material submetido à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.5.1.1.

2. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Uma suspensão de macrófagos J774 foi ajustada para $2,0 \times 10^6$ /mL, em meio de cultura RPMI 1640 com 2,5% de soro fetal bovino, sem vermelho de fenol (GibcoBRL 13200-035) e antibióticos e em seguida plaqueada em microplaca de 96 cavidades (100 µL/cavidade). Após incubação a 37°C por \pm 12 horas (*overnight*) o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura contendo as formulações DRV-DNA, DRV(DNA), Lipoplexo e DNA nu, todos com os plasmídeos pVAX-*hsp65*, pVAX (vetor comercial) ou vazias (sem a presença de DNA), nas concentrações de 10 à 200 µg/mL e a microplaca foi novamente incubada por 24 horas à 37°C.

O meio de cultura contendo as formulações foi substituído por outro sem soro e contendo o corante MTT 0,5 mg/mL (MTT Sigma M-5655), previamente filtrado em membrana de 0,22 µm. As células foram incubadas a 37°C por 4 horas, tempo necessário para ocorrer a redução do sal de tetrazólio ao formazan. O meio de cultura foi cuidadosamente retirado e a cada cavidade foram adicionados 0,1 mL de isopropanol contendo HCl 0,1 M, para a solubilização do formazan. As microplacas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância referente a cada cavidade foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro µQuant Bio-Tek Instruments Inc. (Denizot & Lang, 1986). O ensaio foi realizado em quadruplicata

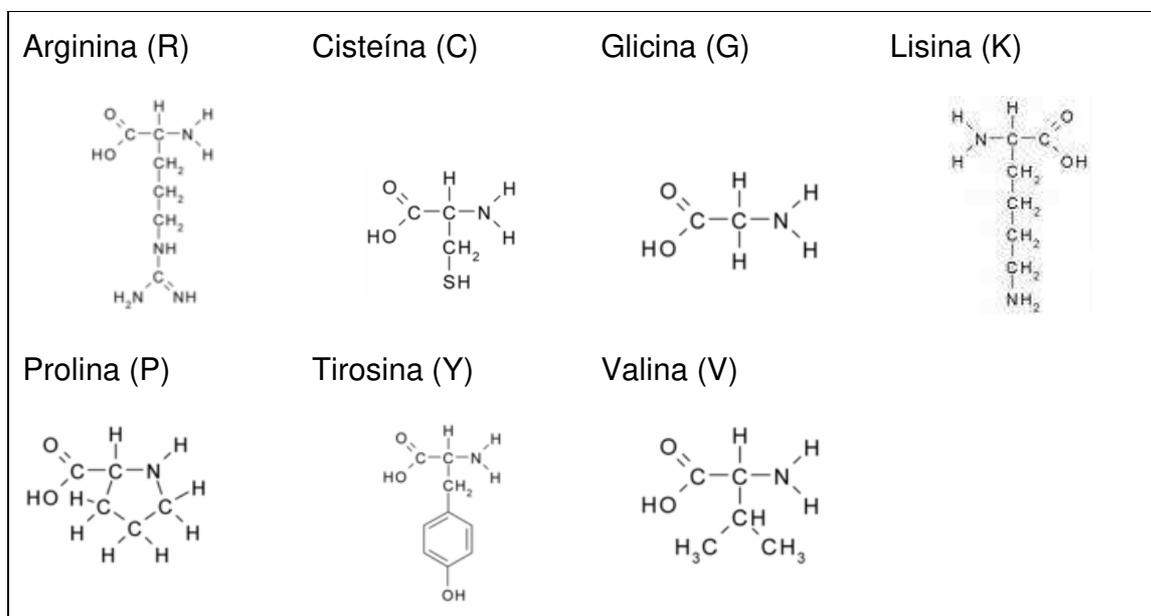
para cada formulação. Como controles foram utilizados macrófagos tratados somente com meio de cultura RPMI 1640 ou formulações vazias, nos quais se considera como 100% de redução do corante MTT. Os resultados estão expressos em gráfico.

ANEXO VII: Relação molar entre cargas positivas do peptídeo e negativas do DNA

A proporção entre DNA e peptídeo foi estabelecida em termos da razão molar entre cargas positivas disponíveis para complexação presente no peptídeo e grupos fosfato presente no DNA (PO_4^{3-}).

A relação molar entre as cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA foi obtida, estabelecendo-se inicialmente a carga positiva líquida por molécula de peptídeo disponível para complexar-se com PO_4^{3-} proveniente do DNA. Para isso, as estruturas moleculares dos aminoácidos que compõe o peptídeo foram estudados individualmente, sendo essas respectivas estruturas apresentadas no Quadro 2:

Quadro 2: Aminoácidos envolvidos na formação do peptídeo com sinal direcionador para núcleo.



Em seguida, foi possível estabelecer para cada aminoácido a quantidade de amins disponíveis para interagir eletrostaticamente com o PO_4^{3-} proveniente

do DNA, sendo estes apresentados na Tabela 19, considerando as cargas das cadeias laterais das lisinas e das argininas.

Tabela 19: Quantidade de aminos disponíveis para interação eletrostática com PO_4^{3-} .

Aminoácido	Aminos disponíveis para interação eletrostática com PO_4^{3-}
Arginina (R)	1
Cisteína (C)	0
Glicina (G)	0
Lisina (K)	1
Prolina (P)	0
Tirosina (Y)	0
Valina (V)	0

Considerando-se a sequência de aminoácidos do peptídeo e lembrando que o terminal amina desta molécula foi acetilado, pode-se estabelecer a carga líquida de aminos disponíveis por molécula de peptídeo, conforme apresentado na Tabela 20:

Tabela 20: Estabelecimento da carga líquida de aminos disponíveis para interação eletrostática com PO_4^{3-} .

Aminoácido	K	C	R	G	K	V	P	G	K	Y	G	K	G	P	K	K	K	R	K	V	C
Carga líquida	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
Carga Total	10																				

Desta forma, torna-se possível estabelecer uma relação estequiométrica entre moles/massa de peptídeo e moles de cargas positivas que interagem com o DNA, possibilitando que várias complexações envolvendo DNA e peptídeo tenham sido realizadas em várias proporções (razões molares). Cada proporção significa uma razão diferente, conforme apresentado na Equação 31.

$$\text{razão molar } NH_4^+ / PO_4^{3-} = \frac{\text{moles de cargas positivas proveniente do peptídeo}}{\text{moles de } PO_4^{3-} \text{ proveniente do DNA}}$$

Equação 28

ANEXO VIII: Determinação do tempo de eletroforese para o complexo binário DNA-peptídeo

Foi possível identificar que o tempo de eletroforese influencia na dissociação deste complexo. Eletroforeses realizadas em 40 minutos permitem uma identificação da condição em que este complexo se encontra, sem que o efeito eletroforético influencie. Se o tempo de eletroforese é elevado para cerca de 2 horas, pode-se verificar que o DNA passa a ser liberado gradativamente para o gel, onde identifica-se que o complexo DNA/peptídeo está sendo desfeito. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 63 A e B.

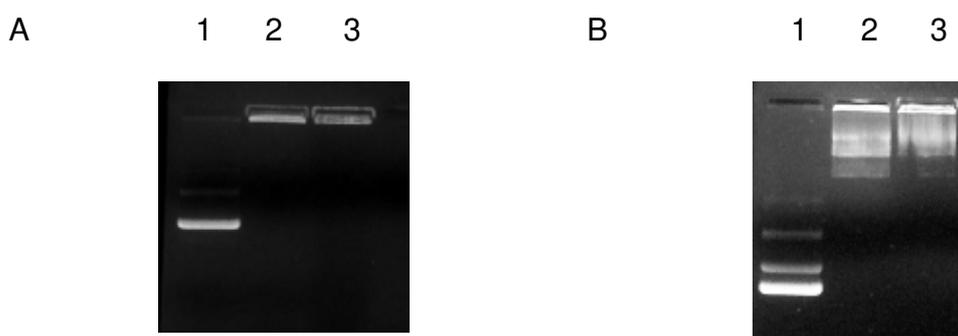


Figura 63: Eletroforese em gel de agarose 0,75% do complexo DNA-peptídeo (com seqüência de aminoácidos com sinal direcionador para núcleo celular) em solução salina 0,9% em duas proporções molares de cargas positivas do peptídeo e PO_4^{3-} do DNA. Eletroforese após A) 40 minutos e B) 2 horas de corrida. Para ambas as Figuras 4 A e B, as linhas representam: 1) DNA (pVAXhsp65); Razão molar $\text{NH}_4^+/\text{PO}_4^{3-}$ 2) 1; 3) 10.

Desta forma, o tempo de eletroforese escolhido para as análises eletroforéticas foi de 40 minutos, pois evita-se que a dissociação dos complexos DNA/peptídeo pelo efeito eletroforético.

ANEXO IX: Determinação da temperatura de evaporação do etanol

A expressão que estima a pressão de vapor para uma dada temperatura é dada por Perry, 1997, conforme a Equação 29.

$$P_{vap} = \exp \left[C_1 + \left(\frac{C_2}{T} \right) + C_3 \cdot \ln T + C_4 \cdot T^{C_5} \right] \quad \text{Equação 29}$$

onde,

P_{vap} : Pressão de vapor, Pascal (Pa)

T: Temperatura, K

C_1 : 74,475

C_2 : -7164,3

C_3 : -7,327

C_4 : $3,1340 \times 10^{-6}$

C_5 : 2

Para o caso de se determinar a temperatura de evaporação para uma determinada pressão, é possível rearranjar a Equação 29 e obter uma equação não linear, apresentada na Equação 30:

$$C_1 + \left(\frac{C_2}{T} \right) + C_3 \cdot \ln T + C_4 \cdot T^{C_5} = \ln(P_{vap}) \quad \text{Equação 30}$$

Onde os parâmetros P_{vap} , T, C_i são os mesmos da Equação 30.

Desta forma, para o vácuo de 650 mmHg (Pressão absoluta de 110 mmHg ou 14665 Pa), a temperatura que promoverá evaporação do etanol é 40°C.