



**Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa**

***DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMA CATIONICO  
CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO PARA  
VEICULAÇÃO DE DNA***

CAMPINAS, 2012





**UNICAMP**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa**

# **DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMA CATIÔNICO CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO PARA VEICULAÇÃO DE DNA**

*Orientadora:* Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na área de concentração de Desenvolvimento de processos biotecnológicos

**Este exemplar corresponde a versão da tese defendida pela aluna Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa e orientada pela Prof.Dra.Lucimara Gaziola de La Torre**

**Assinatura do Orientador**

CAMPINAS, 2012





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

Corrêa, Gabriela de Sá Cavalcanti

C817d      Desenvolvimento de lipossoma catiônico contendo ácido hialurônico para veiculação de DNA / Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Lucimara Gaziola de La Torre.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomas. 2. Transfecção. 3. Ácido hialurônico. 4. Nanotecnologia. 5. Vacinas. I. Torre, Lucimara Gaziola de la. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Development of cationic liposome with hyaluronic acid for gene therapy

Palavras-chave em Inglês: Liposome, Transfection, Hyaluronic acid, Nanotechnology, Vaccine

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Adriano Rodrigues Azzoni, Leide Passos Cavalcanti

Data da defesa: 30-11-12

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química



Dissertação de mestrado defendida por Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa e aprovada no dia 30 de novembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Lucimara Gaziola de La Torre', written over a horizontal line.

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre  
Orientadora

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Adriano Rodriguez Azzoni', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Adriano Azzoni

Membro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leide Cavalcanti', written over a horizontal line.

Leide Cavalcanti

Membro



## **AGRADECIMENTOS**

---

Este trabalho foi possível graças à colaboração de muitas pessoas, principalmente à Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre pela orientação, apoio e incentivo durante todo o período de trabalho.

Agradeço ao Profa. Dra. Maria Helena Santana por ter disponibilizado o uso do seu laboratório e ao técnico Gilson Maia;

Agradeço a todos os colegas do laboratório de desenvolvimento de processos biotecnológicos e do laboratório de Nano e biotecnologia para desenvolvimento de processos avançados;

Agradeço a Profa. Dra. Lilia por ter disponibilizado o uso do seu laboratório do SIPED; e a técnica Cristina;

Agradeço a Profa. Dra. Elizabete por ter disponibilizado o uso do seu laboratório e a Profa. Dra. Thais Rigoletto;

À professora Anete, pelo uso do laboratório, e aos colegas do CBMEG;

Ao Instituto Butantã, especialmente Sylvia e Simone, pelo suporte técnico nas análises de microscopia eletrônica de transmissão

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP, pelo financiamento.

## RESUMO

---

Esta pesquisa visou o desenvolvimento de lipossomas catiônicos contendo o DNA plasmideal e recobertos com o ácido hialurônico, para o desenvolvimento de novas estratégias de vacinas gênicas. Os lipossomas foram compostos dos lipídios: fosfatidilcolina natural de ovo (EPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). A primeira etapa, avaliou-se a influência do tipo de lipossoma (extrudado ou DRV – “Dehydrated-rehydrated”) e de duas massas molares de ácido hialurônico (HA 6 e 16 kDa) nas propriedades dos complexos finais. Lipossomas extrudados apresentaram diâmetro médio reprodutível, quando comparado com lipossomas do tipo DRV. Surpreendentemente, complexos formados por lipossomas extrudados e HA 16 kDa apresentaram diâmetro na faixa nanométrica (200-400nm). Na segunda etapa, estudou-se o efeito da incorporação de um DNA modelo nas estruturas contendo HA e lipossomas catiônicos através da construção do perfil de diâmetro médio e potencial zeta em função da razão molar entre as cargas positivas (dos lipídeos catiônicos) e das cargas negativas proveniente do DNA ( $R_{+/-}$ ). A proporção escolhida foi  $R_{+/-} = 3$ , pois permite toda a incorporação do DNA na estrutura lipossomal. Estudos de transfecção mostraram que a presença do HA nas estruturas eleva a eficiência de transfecção em células HeLa, porém de forma independente da quantidade de HA. A partir destes estudos, amostras contendo LACKDNA/Lipossomas catiônicos/HA foram preparadas e enviadas para estudos in vivo no Laboratório de Imunofarmacologia - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ para avaliação da capacidade destas nanoestruturas na vacinação contra a Leishmaniose.

**Palavras chave:** *Lipossomas catiônicos, ácido hialurônico, pVAXLUC, LACK DNA, vacinação gênica, Leishmaniose.*

## ABSTRACT

---

This research has the goal of develop a vaccine composed of liposome containing DNA and covered by hyaluronic acid as a new strategy for gene delivery. The hyaluronic acid is a natural polysaccharide with mucoadhesive properties and has been used in vaccines using nasal route. This biopolymer allows the increase in the gene delivery in liposome systems because it has specific signals for the cells, CD44 and RHAMM. The liposomes use in this research are composed of egg phosphatidylcholine(EPC), 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane(DOTAP), 1-alpha-dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE), and hyaluronic acid used was of low molecular weight (6 and 16 kDa). The first step study the influence of the kind of liposome (extruded liposome or DRV – “Dehydrated-rehydrated”) and polymer molecular weight. The final properties of the systems were checked. Extruded liposomes show diameter results more reproductive compared to DRV. The complexe of HA 16 kDa and extruded liposomes has the diameter in the nano scale (200-400 nm). The morphology of these complexes indicat the HA is covering the liposome. In a second step study the DNA incorporation in liposome using the construction of diameter and zeta potential profile in function of molar charge ratio ( positive molar charge from cationic lipid/ molar negative charge ratio from DNA).The best molar charge ratio considered was 3 for futher studies with liposome , DNA and HA. Transfection studies demonstrated that the HA presence increase the eficiencia of gene delivery in HeLa cells, no matter the amount of HA. Using this study, the structures composed of liposome/LACKDNA/HA, are prepared to be used in *in vivo* and *in vitro* studies of Leishmanioses in the Carlos Chagas Institute/UFRJ.

**Keywords:** Liposomes; Transfection; hyaluronic acid; Nanotechnology.

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos .....	ix
Resumo .....	x
Abstract .....	xi
Sumário .....	xii
Lista de Figuras .....	xvi
Lista de Tabelas .....	xx
Nomeclatura .....	xxi
Capítulo 1 – Introdução Geral .....	22
1. Introdução .....	22
2. Objetivos .....	23
3. Organização da Dissertação em Capítulos .....	24
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica .....	28
1. Vacinas de DNA .....	28
2. Veiculação da vacina de DNA em lipossomas catiônicos .....	29
3. Liberação sustentada de biofármacos pela rota intranasal .....	31
4. Ácido hialurônico - Biopolímero para aplicações como agente de mucoadesão .....	33
5. Associação entre polímeros e vesículas .....	35
6. Associação entre ácido hialurônico e lipossomas catiônicos e sua aplicação na liberação de DNA .....	39
7. Referências .....	42
Capítulo 3 – Association between cationic liposomes and hialuronic acid of low molecular weight .....	53
1. Abstract .....	53

2. Introduction.....	54
3. Materials and methods .....	58
3.1. Materials:.....	58
3.2. Methods .....	58
3.2.1. Liposome preparation and complexation with HA .....	58
3.2.1.1. Extruded Cationic liposome (ECL) and Dehidratated and rehidratated cationic liposome (DRV) preparation.....	58
3.2.1.2. Eletrostatic complexation between hyaluronic acid (HA) and liposome 59	
3.2.1.3. Average diameter and zeta potential .....	59
3.2.1.4. Phase Transition.....	59
3.2.1.5. Langmuir Monolayer measurements .....	60
3.2.1.6. Morphology.....	60
4. Results .....	61
4.1. Physico-chemical properties of EPC/DOTAP/DOPE liposome/AH complexes.....	61
4.2. Langmuir Monolayers of EPC/DOTAP/DOPE in presence of AH.....	66
4.3. Phase transition.....	73
4.4. Morphology.....	76
5. Discussion .....	78
6. Conclusion.....	83
7. References .....	83
Capítulo 4 – Association between low molecular weight hyaluronic acid, cationic liposomes and plasmid DNA for gene delivery applications .....	90
1. Abstract .....	90

2. Introduction.....	91
3. Materials and methods .....	93
a. Materials.....	93
4. Methods.....	93
a. Plasmid DNA amplification .....	93
b. Cationic liposome preparation .....	93
c. Electrostatic complexation between DNA, extruded cationic liposome and hyaluronic acid (DNA/ECL/HA) .....	94
d. Physicochemical characterization.....	94
i. Average hydrodynamic diameter and polydispersity .....	94
ii. Morphology.....	95
iii. Gel retardation assay .....	95
iv. Plasmid DNA accessibility .....	95
e. Culture and transfection of HeLa cells.....	96
5. Results .....	96
a. DNA/ECL pseudo-binary complex .....	96
b. Pseudo Ternary Complex ECL/DNA/HA .....	98
c. In Vitro Transfection of HeLa Cells .....	101
6. Discussion .....	102
7. Conclusion.....	107
8. References .....	107
Capítulo 5 – Preparação dos complexos pseudo-ternários (DNA/lipossomas catiônicos /ácido hialurânico) contendo LACK DNA para estudos <i>in vivo</i> no combate da Leishmaniose.....	111
1. RESUMO.....	111

2. Introdução.....	111
3. MATERIAIS .....	114
a. Materiais para produção das nano partículas.....	114
4. METODOS .....	114
a. Produção de lipossomas catiônicos e incorporação de DNA: .....	114
b. Recobrimento dos lipossomas catiônicos, incorporados com DNA, com ácido hialurônico .....	116
c. Caracterização físico-química das nanopartículas .....	116
i. Diâmetro hidrodinâmico e Potencial zeta .....	116
ii. Eletroforese .....	118
iii. Testes de crioprotetor .....	118
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
6. Conclusão.....	127
7. Referências .....	128
Capítulo 6 – Conclusões Gerais.....	132
Capítulo 7 – Sugestões para Trabalhos Futuros .....	133

## LISTA DE FIGURAS

---

### Capítulo 2

- FIGURA 1: Estrutura molecular do ácido hialurônico (AH) (De Paula 2007)..... 34
- FIGURA 2: Diagrama esquemático apresentando as interações entre surfactante agregado em micelas e ao polímero (Fonte: Myers, 1999) ..... 37
- FIGURA 3: Figura esquemática representando a agregação entre micelas e polímeros (Myers 1999). ..... 38
- FIGURA 4 :Empacotamento devido atração eletrostática (Figura adaptada de Myers 1999). ..... 38

### Capítulo 3

- FIGURE 1: Physico-chemical properties of complexes obtained after the association between HA and cationic liposomes at different HA content. Extruded liposomes (ECL)/HA complexes: A) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter); B) Zeta potential. DRV/HA complexes: C) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter); D) Zeta potential. Error bars correspond to SD of three independent experiments (n=3); HA of 6kDa (■) and 16 kDa(□).The lines are just to guide the eye..... 64
- FIGURE 2: Physico-chemical properties of complexes obtained after the association between HA 16kDa and extruded cationic liposomes (ECL). A) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter ); B) Zeta potential. Error bars correspond to SD of three independent experiments (n=3).The lines are just to guide the eye. .... 65
- FIGURE 3 (A) Surface pressure–area ( $\pi$ -A) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface with different hyaluronic acid 6 kDa. (B) Surface pressure–area ( $\pi$ -A) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface, for a selected expanded molecular area from 15 to 60 °A<sup>2</sup>. The lines are just to guide the eye. .... 69
- FIGURE 4: (A) Surface pressure–area ( $\pi$ -A) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface with different hyaluronic



acid 16 kDa. (B) Surface pressure–area ( $\pi$ -A) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface, for a selected expanded molecular area from 15 to 60  $\text{Å}^2$ . The lines are just to guide the eye..... 72

FIGURE 5: Thermograms of for “empty” ECL and ECL/HA6kDa complexes at 0.25, 0.5; 1; 3 and 30% (w/w). Samples were freeze-dried and heated at 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ . Note: these thermograms are for comparison only as the fast heating temperature (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) would reduce accuracy. .... 73

FIGURE 6: Thermograms of “empty” ECL and and ECL/HA16kDa complexes at 0.25, 0.5; 1; 3, 5 and 30% (w/w). Samples were freeze-dried and heated at 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ . Note: these thermograms are for comparison only as the fast heating temperature (10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) would reduce accuracy ..... 74

FIGURE 7: Transmission electron micrographs of extruded cationic liposome (ECL) (A), ECL/HA 6kDa 0.25% (B), ECL/HA 16kDa 0.25%(C), ECL/HA 16kDa 1% (D), ECL//HA 16kDa 30% (E). Bars correspond to 200 nm (D), 100 nm (A,B,C,F). Optical micrograph for ECL/HA 6kDA 10% (F); Bar corresponds to 20  $\mu\text{m}$ . .... 77

## Capitulo 4

FIG 1: Average zeta potential and diameter profiles of the DNA/extruded cationic liposome complexes as function of molar charge ratio,  $R_{+/-}$ . The error bars represent the standard error of independent triplicates. .... 97

FIG 2: Agarose gel electrophoresis (0.8%) of pseudo-binary cationic liposome/DNA complexes different molar charge ratios ( $R_{+/-}$ ). .... 98

FIG 3: Agarose gel electrophoresis (1.5%) of pseudo-ternary HA/ cationic liposome/DNA complex at different molar HA amounts Lanes: 1)CL-DNA 2) HA/CL-DNA 0.25%;3) HA/CL-DNA 0.5%;4) HA/CL-DNA 1%5) HA/CL-DNA 3%;6) HA/CL-DNA 5%;7) HA/CL-DNA 30%. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was  $R_{+/-} = 3$ ..... 98

FIG 4: Fluorescence profile as function of the amount of hyaluronic acid in the pseudo-ternary DNA/ECL/HA complexes using the PicoGreen probe. Results

with free DNA used as control in ultra pure water. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was $R_{\pm 3}$ . Error bars correspond to standard deviation of three independent experiments.....	99
FIG 5: Transmission electron micrograph of DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes at molar charge ratio of 3 and amount of HA (molecular weight 16 kDa) of 0.25 % (w/w). Scale bars represent 100 nm. ....	101
FIG 6: In vitro efficacy of HeLa cell transfection using “naked” plasmid DNA, DNA + HA 16kDa, DNA/ECL and DNA/ECL/HA complexes at different percentages of HA at molar charge ratio of 3. Luciferase activity was expressed in RLU/mg of protein. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was $R_{\pm 3}$ . The error bars represent the standard error of triplicates. * $p < 0.05$ was considered statistically. ....	102
FIG 7. Schematic representation of the hypothesized mechanism of formation of the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes. The amount of DNA can completely cover the cationic liposome surface and the negative zeta potential sign takes place.....	106

## Capítulo 5

figura 1: Eletroforese em gel de agarose (0.8%) do sistema pseudo ternário ELC-DNA LACK/HA em diferentes proporções de AH. Linha 1) Marcador Molecular 2) DNA LACK; 3) LC-DNA LACK/HA 6kDa 1%; 4) LC-DNA LACK/HA 16kDa 1%; 5) LC-DNA LACK/HA 16 kDa 30%.....	122
figura 2: Expressão de transcritos de LACK: macrófagos transfectados com 6 $\mu$ g de LACK-DNA em diferentes formulações. Após o tempo de incubação, o RNA foi extraído das células, tratados com DNase e usado para qRT-PCR usando $\beta$ -actina como controle endógeno O grupo incubado com LACK-DNA livre foi usado como amostra de referência para o cálculo de QR e tem QR=1. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao LACK-DNA.....	123
figura 3: Citotoxicidade das formulações lipossomais: Os macrófagos ( $3 \times 10^6$ ) foram incubados a 37°C com as formulações indicadas contendo 6 $\mu$ g de LACK-DNA e nas proporções indicadas na tabela 3 por 6 horas, quando as células foram lavadas e incubadas por mais 18 horas em meio de cultura. A quantidade de LDH foi medida no sobrenadante após o tempo total de 24 horas. A liberação espontânea de LDH (meio somente) foi de 10% do Triton. Média $\pm$ SD (n=3). ....	124
figura 4: Eficácia da vacina LACK-DNA em diferentes formulações contra infecção por <i>L. amazonensis</i> . Camundongos BALB/c n=5 foram pré-imunizados com	

duas doses de 30  $\mu$ g cada de LACK-DNA nas diferentes formulações em intervalos de 1 semana entre as doses. Uma semana após a última imunização intranasal os animais foram infectados na pata direita com  $2 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* josefa na fase estacionária. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado através da medição da pata e expresso em média com erro padrão, do  $\Delta$  obtido ( $\Delta$  = leitura da espessura do dia avaliado – leitura obtida no dia da injeção). ..... 125

figura 5: Carga parasitária de camundongos BALB/c n=5 (suspeitos de não serem isogênicos) infectados com *L. amazonensis* vacinados com diferentes formulações lipossomais. Após o final do acompanhamento da lesão, os animais foram submetidos à eutanásia e avaliada carga parasitária no macerado de lesão pelo método de diluição limitante (LDA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD (n=5). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo PBS. .... 126

## LISTA DE TABELAS

---

### Capítulo 3

Table 1: Colapse pressure for monolayers composed by EPC/DOTAP/DOPE (50/25/25 % molar) containing hyaluronic acid (HA) in the sub-phase with two different molar weights and at different proportions. ....	70
Table 2: Melting temperatures for “empty” ECL and ECL/HA complexes. Samples were freeze-dried and heated at 10 °C/min* .....	75

### Capítulo 4

TAB 1: Physicochemical properties of extruded cationic liposomes (ECL), ECL/DNA binary complexes and DNA/ECL/HA pseudo ternary complexes. ....	100
--	-----

### Capítulo 5

tabela 1: Características físico químicas antes de depois de liofilizar os complexos LC 100 NM /HA 6 e 16kDa) diferentes proporções em massa .....	120
tabela 2: Características físico químicas antes de depois de liofilizar os complexos LC 100 NM /HA 16kDa com 1%(partícula positiva) e 30%(partícula negativa) mais o crioprotetor (trealose) em diferentes proporções em massa em relação a massa de lipídio .....	120
tabela 3: Características Físico- Químicas das formulações enviadas para testes in vivo.....	122

## NOMECLATURA

---

DNA:	Ácido desoxirribonucleico;
DOPE:	L- $\alpha$ -dioleoil fosfatidiletanolamina;
DOTAP:	1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano;
DRV:	<i>Dehydrated-hydrated vesicles</i> ;
ECL:	Extruded <i>Cationic Liposomes</i>
EPC:	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de ovo;
EtBr:	Brometo de etídio;
HA:	Ácido Hialurônico;
HeLa:	<i>Human epithelial carcinoma</i> ;
LACKDNA	<i>plamideo que codifica a proteína LACK</i>
Luc:	Luciferase;
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão;
Pdl:	<i>Polydispersity Index</i> ;
pDNA:	DNA plasmideal
R <sub>+/-</sub> :	Razão molar de cargas, relação entre moles de cargas positivas de lipídios catiônicos e cargas negativas do DNA;
SD:	<i>Standard Deviation</i> ;
TAE 1 X:	Solução tampão contendo 40 mM TRIS-Acetato, 1 mM EDTA;
TRIS:	Tris[hidroximetil]aminometano
TEM:	Trnasmission Eletron microscopy;
$\zeta$ :	Potencial Zeta

---

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

---

### **1. Introdução**

Doenças negligenciadas são doenças que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados como: a leishmaniose, a tuberculose, a doença do sono, malária, e a doença de Chagas.

Neste contexto, a prevenção é uma estratégia importante e o desenvolvimento de vacinas é um importante fator para a minimização de ocorrências destas doenças.

Na busca de alternativas, as vacinas de DNA são promissoras e possuem a capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas às das proteínas selvagens, maior estabilidade, capacidade de gerar respostas humorais e celulares mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única.

O Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB), da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP iniciou pesquisas voltadas para a veiculação de vacinas de DNA para a tuberculose pela rota intranasal, na qual lipossomas catiônicos foram utilizados. Os resultados mostraram-se promissores para a prevenção da tuberculose (Rosada et al 2008 e de La Torre et al., 2009).

A rota intranasal é considerada promissora devido à constituição da mucosa nasal (Davis, 2001 e Partidos, 2000), pois a região nasal é rica em tecido linfóide e é altamente vascularizada (Almeida et al., 1996). Além disso, a administração nasal é barata, simples, permite a eliminação de agulhas, diminuindo o risco de doenças infecciosas (Zouh et al., 2010).

Para a aplicação intranasal, a própria natureza catiônica dos lipossomas já apresenta por si só uma característica adesiva. Porém, existem atualmente, novas estratégias de elevação da eficiência de transfecção de vacinas de DNA que

podem ser incorporadas às existentes atualmente, tal como o emprego de agentes mucoadesivos.

Existem também várias moléculas consideradas como agentes mucoadesivos, tais como o ácido hialurônico, a quitosana, o carbopol, dentre outros (Andrews et al., 2009, Kharenko et al., 2009).

A partir dos conhecimentos adquiridos pelo LDPB para vacinação gênica utilizando lipossomas, esta pesquisa pretende estender os conhecimentos adquiridos até então e verificar a influência da utilização conjunta do biopolímero ácido hialurônico, naturalmente mucoadesivo na eficiência de vacinação.

## **2. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi o de contribuir na área da nanobiotecnologia, mais especificamente para o desenvolvimento de um novo sistema nanoparticulado para veiculação de DNA para o interior de células. Para tal, a partir de lipossomas catiônicos obtidos por processo de formação do filme seco com posterior extrusão usando membrana de 100 nm de poro(ELC), e lipossomas catiônico obtidos pela técnica de desidratação-rehidratação (DRV), estudou-se o processo de complexação eletrostática com o ácido hialurônico(HA).

A pesquisa foi estruturada a partir dos três principais objetivos:

- Caracterização dos complexos Lipossomas.HA: Determinação das condições de complexação lipossomas e ácido hialurônico, investigando o efeito da massa molecular do HA e o tipo de lipossoma (extrudado ou DRV).
- Estudo dos complexos ECL/HA/DNA e sua aplicação em transfecção: Avaliação da complexação ECL e DNA (modelo), e posterior complexação com o HA 16kDa e avaliação *in vitro* da transfecção em células HeLa das melhores condições.
- Estudo do desenvolvimento das partículas para a veiculação do LACK DNA contra a Leishmaniose: Nesta etapa foi desenvolvido a partícula composta de lipossoma catiônico extrudados, LACK DNA e ácido hialurônico 16 kDa em diferentes quantidade do biopolímero e com a carga de DNA desejada para testes contra a Leishmaniose. As nanoestruturas foram enviadas para o

## *Capítulo 1*

Instituto Carlos Chagas Filho para que fossem realizados testes de transfecção em macrófagos e teste *in vivo* do sistema ECL/DNA/HA realizados como parte da tese de mestrado da aluna Mirian França no Laboratório de Imunologia da UFRJ sob coordenação da Profa. Dra Bartira Rossi-Bergami.

### **3. Organização da Dissertação em Capítulos**

A apresentação desta dissertação foi organizada em capítulos, conforme descrito a seguir. Os resultados estão divididos na forma de artigos que serão submetidos a periódicos internacionais, selecionados de acordo com a afinidade do conteúdo abordado. Dessa forma, os itens introdução, metodologia, resultados e discussão, e conclusões de cada etapa constam nos artigos em seus respectivos capítulos.

#### *Capítulo 1 – Introdução Geral*

Uma revisão geral do trabalho incluindo motivação, revisão de literatura, resultados é apresentado neste capítulo.

#### *Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica*

No capítulo 2 é apresentado os conceitos de vacina gênica, lipossomas, associação de lipossomas e biopolímeros presentes na literatura.

#### *Capítulo 3 – Association between cationic liposomes and hialuronic acid of low molecular weight*

Apresentado na forma de artigo científico, que será submetido para a revista internacional *Colloids and Interface Science* (A1 – Qualis CAPES). Nesta primeira parte da pesquisa, realizou-se o estudo da complexação eletrostática entre lipossomas catiônicos e ácido hialurônico. Nesta etapa, investigou-se a influência do tipo de lipossoma (extrudado ou DRV – “Dehydrated-rehydrated”) e duas massas molares de ácido hialurônico (HA 6 e 16 kDa) nas propriedades dos complexos finais. Estudos físico-químicos revelaram que existe grande influência da forma de agregação dos lipossomas e da massa molecular. Lipossomas extrudados apresentaram diâmetro médio reprodutível, quando comparado com



lipossomas do tipo DRV. Surpreendentemente, complexos formados por lipossomas extrudados e HA 16 kDa apresentaram diâmetro na faixa nanométrica (200-400nm), enquanto para HA 6kDa. Estudos em monocamadas de Langmuir revelaram que HA de 16kDa causa maior instabilidade da bicamada (compressão das monocamadas), justificando o menor diâmetro encontrado dos complexos. O mesmo comportamento foi encontrado para calorimetria exploratória diferencial. A morfologia obtida destes complexos sugere que o HA esteja realizando um revestimento nos lipossomas. Estes estudos contribuíram para o entendimento da complexação eletrostática envolvendo lipossomas e HA.

#### Capítulo 4 – Association between low molecular weight hyaluronic acid, cationic liposomes and plasmid DNA for gene delivery applications

Nesta etapa do projeto, estudou-se o efeito da incorporação do DNA nas estruturas contendo HA e lipossomas catiônicos. Utilizou um DNA plasmideal modelo, que possui um “gene repórter” (luciferase) e que permitiu que estudos de transfecção *in vitro* fossem realizados em células HeLa. Desta forma, a segunda etapa desta pesquisa foi realizada com o plasmideo modelo, permitindo a escrita de um artigo científico que será submetido para a revista *Colloids and Surfaces: B* (Qualis A1). A incorporação do DNA nos lipossomas catiônicos foi avaliada através da construção do perfil de diâmetro médio e potencial zeta em função da razão molar entre as cargas positivas (dos lipídeos catiônicos) e das cargas negativas proveniente do DNA ( $R_{+/-}$ ). A proporção escolhida foi  $R_{+/-} = 3$  permite toda a incorporação do DNA na estrutura lipossomal, sendo esta utilizada para a complexação eletrostática envolvendo DNA/Lipossomas catiônicos/HA. A partir do primeiro estudo, foi possível identificar que o HA 16 kDa apresentou-se mais eficiente no controle do diâmetro médio das partículas e desta forma, somente este HA foi utilizado nos estudos do complexo DNA/Lipossomas catiônicos/HA. Estes complexos apresentaram diâmetro que aumenta não linearmente com o aumento de HA e estudos de fluorescência e eletroforese em gel de agarose identificaram que o DNA mantém-se nos complexos finais. Estudos de transfecção

## Capítulo 1

mostraram que a presença do HA nas estruturas eleva a eficiência de transfecção em células HeLa, porém de forma independente da quantidade utilizada de HA. Somente a presença de HA, mesmo em 0,25% promove um aumento do nível de transfecção quando comparada a mesma estrutura sem o HA. Estas células apresentam os receptores CD44 e RHAMM, que reconhecem o HA para internalização celular destes complexos. Estes resultados sugerem que o emprego de HA permite melhora na transfecção, possivelmente a partir de um mecanismo específico, via receptores para o interior das células.

## Capítulo 5 – Desenvolvimento de sistema nanoparticulado para veiculação de LACKDNA no combate a Leishmaniose

Neste item são apresentados os estudos para ajuste da formulação ternária (DNA/lipossomas catiônicos/HA) para atender os requisitos de concentração (1 $\mu$ g/ $\mu$ L de DNA) e utilizando o plasmideo para vacinação contra a Leishmaniose (LACK DNA). O desenvolvimento das condições para a complexação eletrostática envolvendo HA e lipossomas catiônicos anteriormente estudado utilizava condições diluídas para evitar que agregações descontroladas ocorressem. Desta forma, para o ajuste de concentração, as complexações foram realizadas da mesma forma desenvolvida no item anterior e foram submetidas à secagem (liofilização) na presença de trealose como crioprotetor. As amostras foram preparadas em condições estéreis e enviadas para o Laboratório de Imunofarmacologia - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, que está responsável pela realização dos experimentos *in vivo*. Os ensaios *in vivo* estão atualmente sendo conduzidos.

## Capítulo 6 – Conclusões Finais

Neste capítulo, as conclusões gerais do projeto foram apresentadas levantando as descobertas realizadas em relação a literatura.

## Capítulo 7 – Sugestões para Trabalhos Futuros

Neste capítulo são apresentados projetos para continuação e viabilização do uso do sistema nanoparticulado desenvolvido para a aplicação como vacina gênica em larga escala.

---

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 1. Vacinas de DNA

Na busca de alternativas, as vacinas de DNA são promissoras e possuem incluem a capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas às das proteínas selvagens, maior estabilidade, capacidade de gerar respostas humorais e celulares mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única.

O DNA administrado livremente é quimicamente instável devido a presença de vários componentes corpóreos. Além disso, a característica aniônica e o tamanho do DNA dificultam o processo de transfecção (Lasic, 1997). Apesar de ser possível a administração de DNA nu como vacinas, estes sistemas não são ideais, pois implicam na necessidade de utilização de grandes dosagens de DNA para obtenção do efeito imunológico.

Desta forma, os efeitos de veiculadores têm sido investigados com o objetivo 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.

Os veiculadores de DNA podem ser classificados em virais e não virais. Os vetores virais baseiam-se na capacidade dos vírus de liberar seu material genético nas células infectadas. Os veiculadores não virais podem ser formados a partir do emprego de lipídios catiônicos, contidos em agregados lipossomais, biopolímeros naturais tal como quitosana ou polímeros sintéticos tal como polietilenoimina (PEI).

Apesar de apresentarem maior eficiência de entrega de DNA no interior das células, os sistemas virais apresentam certas limitações tais como elevado custo, desenvolvimento de respostas imunogênicas, e possíveis efeitos oncogênicos (Pedroso de Lima et al., 2003). Neste contexto, muitos estudos estão direcionados para o desenvolvimento de vetores não virais, onde se destacam os lipossomas catiônicos (Torre et al., 2009).

No caso específico do LACK DNA, no qual a eficácia parcial na vacinação contra a Leishmaniose cutânea (Pinto et al., 2004) e visceral (Gomes, et al., 2007) é conhecida, justifica-se o emprego de sistemas nanoestruturados não-virais projetados para melhorarem sua eficácia, visando o desenvolvimento de uma nova vacina contra a Leishmaniose.

## **2. Veiculação da vacina de DNA em lipossomas catiônicos**

Os lipossomas catiônicos apresentam-se promissores, pois permitem a proteção do DNA e o acoplamento na sua 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 (Labas et al., 2010, De Rosa & La Rotonda, 2009 e Lasic, 1993).

Lipossomas são agregados lamelares de bicamadas lipídicas, alternadas por um ou mais domínios aquosos internos, formando partículas aproximadamente esféricas com diâmetros da ordem de nanômetros a dezenas de micra. Esses agregados são capazes de encapsular na sua matriz diversos compostos. As lamelas atuam como membranas que protegem os compostos carregados das agressões do meio biológico e promovem a sua liberação sustentada. Essas propriedades permitem que a dose e frequência de administração sejam reduzidas. Em geral, os lipossomas são biodegradáveis e atóxicos dependendo da sua composição (Lasic, 1993).

O transporte efetivo de nucleotídeos para o interior das células foi conseguido com a utilização de lipídios catiônicos, como reportado por Felgner (1987), em mecanismo denominado lipofecção. Desta forma, lipídios catiônicos foram usados para carrear nucleotídeos por meio de simples complexação eletrostática. Vários lipídios catiônicos sintéticos têm sido usados, dentre os quais os sais quaternários de amônio, tais como o brometo de dimetildioctadecil amônio (DDAB) e o 1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano (DOTAP), são os mais conhecidos como carreadores de nucleotídeos (Labas et al. 2010).

No processo de transporte para o interior das células, os lipossomas catiônicos são inicialmente internalizados preferencialmente através do mecanismo de endocitose. Em uma segunda etapa é necessário que os nucleotídeos sejam liberados da membrana, possivelmente por ruptura da membrana que se desestabiliza devido a interações entre os lipídios catiônicos e suas moléculas aniônicas (Wattiaux et al., 1997). Dentro desse mecanismo, a presença de fosfatidiletanolaminas (PEs), também designadas como *helpers*, intensifica o processo de liberação por possuírem características fusogênicas, que facilitam a desestabilização da membrana endossomal (Felgner et al., 1994). Porém, a fusão dos lipídios associados ao DNA com a membrana endossomal provocada pelas PEs não ocorre diretamente com a membrana citoplasmática, sendo necessária a etapa inicial da endocitose (Wrobel & Collins, 1995). Por essa razão as PEs são também designadas na literatura como co-lipídios em relação aos lipídios catiônicos.

Dentre as PEs, é mais conhecida a ação fusogênica do DOPE. Sua importância nos estudos de potencialização da liberação dos nucleotídeos *in vitro* com lipídios catiônicos, deve-se à sua capacidade de passar para a fase hexagonal H<sub>II</sub>, facilitando a desestabilização da membrana endossomal e promovendo a liberação dos nucleotídeos no citoplasma através da troca de lipídios do endossoma com a membrana lipossomal.

Em geral, a geometria molecular dos anfifílicos catiônicos e do DOPE, por si só não favorece a agregação em bicamadas lamelares nas condições fisiológicas. Os agregados formados são instáveis, havendo co-existência entre as fases lamelar e hexagonal tal como reportado por Rädler et al. (1997), com o DNA intercalado nas estruturas. A associação de lipídios catiônicos e DOPE com fosfolipídios estruturais tais como fosfatidilcolinas (PCs) é imprescindível para a formação de lipossomas, os quais são constituídos de bicamadas regulares ou lamelas, que se agregam intercalando domínios aquosos e gerando partículas coloidais aproximadamente esféricas.

Duzgunes et al. (1989) demonstraram a existência de uma correlação direta entre fluidez da bicamada e atividade de transfecção. Portanto, as PCs devem ter

temperatura de transição de fases baixa, tal como a fosfatidilcolina natural de ovo (EPC), que na temperatura corpórea, os lipídios da membrana lipossomal encontram-se no estado líquido-cristalino, conferindo-lhe a fluidez necessária para facilitar a ação do DOPE e do lipídeo catiônico (DOTAP) no transporte dos nucleotídeos para o interior das células. Além disso, a inclusão de EPC nas formulações demonstrou que a citotoxicidade *in vitro* é drasticamente reduzida (de La Torre et al, 2009).

A experiência prévia do grupo de pesquisadores deste projeto iniciou-se com o desenvolvimento da nanoestrutura lipossomal incorporando o DNA-hsp65 (Torre, 2006). A composição lipídica apresenta os três lipídios EPC/DOPE/DOTAP, com funcionalidades de incorporação do DNA e ligação eletrostática com a superfície das células, intensificação da liberação do DNA no citoplasma celular e estruturação em nanopartículas, utilizando a composição lipídica otimizada por Perrie et al. (2001). Os resultados mostraram a baixa citotoxicidade e a potencialidade destas nanoestruturas para vacinação gênica pela rota intranasal (Rosada et al., 2008, de La Torre et al., 2009, Torre et al. 2007 - Patente Brasileira PI 0705630-3, Torre et al., 2008, C1 0705630-3).

Apesar dos resultados promissores de aplicações intranasal das vacinas lipossomais contendo DNA, é interessante que o projeto de sistemas nanoparticulados seja continuado, focando agora a elevação da eficiência da entrega do DNA por esta rota. Desta forma, novas estratégias visando a elevação do efeito imunológico são fundamentais para a otimização de novas formulações, possibilitando também estudos futuros de entrega de outros tipos de ácidos nucleicos, como RNAs e outros tipos de DNAs para vários tipos de doenças, tal como a Leishmaniose.

### **3. Liberação sustentada de biofármacos pela rota intranasal**

A rota intranasal é considerada promissora devido à constituição da mucosa nasal (Davis, 2001 e Partidos, 2000), pois a região nasal é rica em tecido linfóide e é altamente vascularizada (Almeida et al., 1996). Esta característica permite a

indução da imunidade da mucosa e sistêmica a partir da vacinação pela rota nasal de animais e humanos (Ugwoke et al. 2005). A administração nasal é barata, simples, permite a eliminação de agulhas, diminuindo o risco de doenças infecciosas (Zouh et al., 2010).

A mucosa nasal é responsável por proteger o tecido epitelial, que possui vasos sanguíneos, células do sistema linfático, destacando-se o tecido linfóide associado à mucosa (NALT), que é a base da cavidade nasal, importante na defesa e proteção do organismo vivo. No entanto, a mucosa é considerada uma barreira dinâmica e semipermeável, que permite, por exemplo, a troca de nutrientes tais como água, gases, odores e impede a passagem de muitas bactérias e patógenos (Cone, 2009). Mais especificamente, o muco respiratório é formado por uma rede tridimensional de cadeias de mucina reticuladas, proporcionando propriedades viscoelásticas (Lethem, 1993). A mucina é de natureza aniônica e sua massa molar varia entre 2 e 26 MDa. Adicionalmente, existem moléculas livres como proteínas, lipídeos, proteoglicanos e eletrólitos (Sanders et al.; 2009).

Pelo fato do muco ser continuamente secretado, existe um sistema de limpeza (“clearance”), através de movimentos mucociliares (Sanders et al.; 2009), responsável pela retirada de material particulado. Este processo de “clearance” e a própria natureza viscoelástica do muco tornam-se uma barreira natural para a administração intranasal de macromoléculas de ação terapêutica e também de sistemas micro e nanoparticulados para a veiculação destes biofármacos (Csaba, et al., 2009). Desta forma, um sistema nanoparticulado adequado para vacinação intranasal deve vencer esta barreira estabelecida pela mucosa, para que a molécula com ação terapêutica possa atingir as células do tecido epitelial. Para atingir este objetivo, duas abordagens são encontradas atualmente na literatura para a entrega de DNA.

A primeira abordagem refere-se à utilização de nanopartículas capazes de penetrar o muco e possuem características muco-inertes, formadas a partir do recobrimento das nanopartículas com polímeros inertes, como o polietilenoglicol (PEG) (Lai et al., 2009).

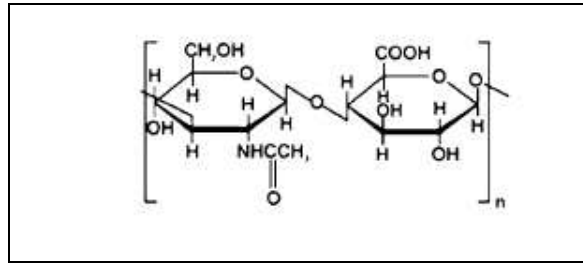


Já na segunda abordagem, são projetadas nanopartículas com propriedades bioadesivas, onde a meta é aumentar o tempo de residência das partículas na superfície da mucosa a fim de elevar a chance de incorporação das nanopartículas pelas células NALT (Andrews et al., 2009, Alpar et al., 2005). O termo bioadesão descreve a capacidade de certas macromoléculas, sintéticas ou biológicas, tem de se aderir a tecidos biológicos e quando a adesão ocorre em mucosas, utiliza-se o termo mucoadesão (Andrews et al. 2009, Tur & Ch`ng, 1998 e Peppas & Shalin, 1996).

Para a aplicação intranasal, a própria natureza catiônica dos lipossomas, oposta ao biopolímero mucina, constituinte do muco, já apresenta por si só uma característica adesiva. Porém, existem atualmente, novas estratégias de elevação da eficiência de transfecção de vacinas de DNA que podem ser incorporadas às existentes atualmente, tal como o emprego de agentes mucoadesivos nos sistemas atuais de “gene delivery”.

#### **4. Ácido hialurônico - Biopolímero para aplicações como agente de mucoadesão**

Existem várias moléculas consideradas como agentes mucoadesivos, tais como o ácido hialurônico, a quitosana, o carbopol, dentre outros (Andrews et al., 2009, Kharenko et al., 2009). O ácido hialurônico é um polissacarídeo presente naturalmente nos tecidos conjuntivos de animais e tem apresentando importantes aplicações na área médica, no tratamento de doenças degenerativas, inflamatórias, dentre outros (Ludwig, 2005, Liao et al., 2005, Illum et al., 1994). Devido a sua característica de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não imunogenicidade e propriedades mucoadesivas, pode também ser utilizado em sistemas micro e nanoparticulados para carreamento e liberação sustentada de biofármacos (Prestwich & Vercruysse, 1998, Pritchard et al., 1996). Sua estrutura química, apresentada, na FIGURA 1, contém unidades alternadas de ácido D-glucorônico e N-acetil-glicosamina, unidas por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ 1-4, constituindo-se como um biopolímero linear, com massa molar entre 50 e 140 Kda (Lehninger, 1988).



**FIGURA 1: Estrutura molecular do ácido hialurônico (AH) (De Paula 2007).**

A estrutura tridimensional do AH é formada por duas cadeias antiparalelas que se enovelam formando uma dupla hélice, estabilizada através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Brown & Jones, 2005, Hascall & Laurent, 1997).

Em solução fisiológica, o esqueleto da molécula de AH é reforçado por uma combinação da estrutura química do dissacarídeo, de ligações internas de hidrogênio e de interações com o solvente. Os átomos axiais de hidrogênio formam uma face relativamente hidrofóbica, não polar enquanto que o lado equatorial da cadeia forma uma face hidrofílica mais polar, criando assim uma estrutura de fita enovelada expandida aleatoriamente que ocupa um grande domínio hidrodinâmico (Hascall & Laurent, 1997).

O AH é um polímero altamente hidrofílico. Cada unidade de ácido glicurônico contém um grupo carboxílico dando ao AH caráter polianiónico em pH fisiológico (pH 7). *In vivo*, todos os grupos carboxílicos do ácido glicurônico e da N-acetilglucosamina estão completamente ionizados, tornando a molécula de AH altamente polar e conseqüentemente altamente solúvel em água. Na presença de água, as moléculas de AH podem expandir em volume até 1000 vezes e formar matrizes imensamente hidratadas (Romagnoli & Belmontesi, 2008, Laurent & Fraser, 1992).

A viscoelasticidade da solução é dependente do pH e é afetada pela força iônica do meio. O pKa dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido glucurônico encontra-se entre 3 e 4, dependendo das condições iônicas. Variações no pH afetam a extensão da ionização da cadeia de AH e essas variações

conseqüentemente alteram as interações intermoleculares e suas propriedades reológicas (Brown & Jones, 2005).

Além da característica muco adesiva, o ácido hialurônico exerce papel importante de sinalização da motilidade e diferenciação celular e da cicatrização de feridas. Este biopolímero também potencializa a absorção de fármacos e proteínas em mucosas (Lim et al., 2000). Em termos de sinalização, muitas células possuem receptores que se ligam ao ácido hialurônico, tal como o receptor de superfície CD44 e o mediador da motilidade (RHAMM) (Naor et al., 2002; Naor et al., 1997). A interação entre AH e receptores celulares de superfície CD44 permite várias atividades biológicas, tais como mediação e agregação de macrófagos (Faassen et al., 1992) e migração celular (Henke et al., 1996).

A propriedade mucoadesiva do AH foi recentemente investigada no estudo de entrega sistêmica de moléculas para o tecido cerebral através da rota intranasal (Horvat et al., 2009). Neste caso uma formulação contendo hialuronato de sódio em combinação com um surfactante não iônico elevou a eficiência de entrega de moléculas hidrofílicas para o tecido cerebral. A aplicação isolada de AH não conferiu os efeitos significativos de entrega das moléculas, mas sua associação com o tensoativo é promoveu os melhores resultados. Segundo os autores, o efeito da diminuição da viscosidade pode ter sido o fator importante para a melhora da entrega da molécula no tecido alvo, indicando que existe uma condição ótima que garanta a mucoadesão, que promova a elevação do tempo de residência e também permita a absorção, neste caso, promovida pelo tensoativo (Horvat et al., 2009).

A associação de ácido hialurônico com lipossomas catiônicos constitui uma estratégia promissora para a entrega de vacinas de DNA. Porém, é interessante que os mecanismos que promovem a associação deste biopolímero com vesículas (lipossomas) sejam compreendidos para o desenvolvimento apropriado de nanopartículas funcionais.

## **5. Associação entre polímeros e vesículas**

O estudo da interação entre surfactantes (iônicos e não-iônicos) (na forma de micelas) e polímeros naturais e sintéticos (neutros ou polieletrólitos) solúveis

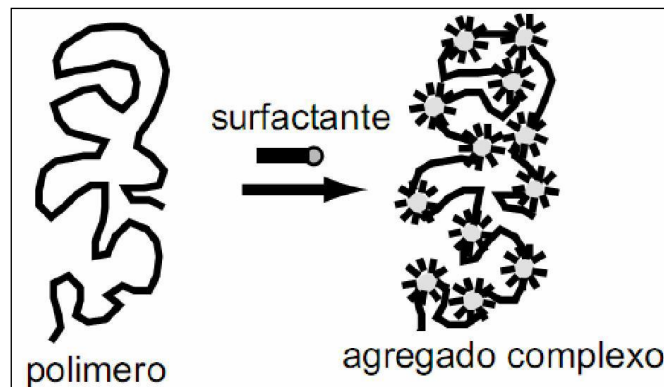
em água é atrativo por contribuírem para o desenvolvimento científico e tecnológico da indústria cosmética e farmacêutica. Nesta categoria, as vesículas, tais como os lipossomas também podem ser analisados conjuntamente, apesar de se encontrar na literatura estudos distintos de associação de vesículas e surfactantes com polímeros. As interações entre polímeros e surfactantes em soluções aquosas é um campo de pesquisas em desenvolvimento rápido. Estas interações são influenciadas pelas características do polímero tais como massa molar, hidrofobicidade, flexibilidade e também pelo tamanho do surfactante, conforme descrito por Thakberg et al 1989.

Uma análise comparativa recente entre estas associações de polímeros com micelas (surfactantes) e vesículas foi realizada por Antunes et al (2009), onde verifica-se que as interações polímero e surfactantes ou polímeros e vesículas lipídicas tem essencialmente as mesmas forças envolvidas como ligação eletrostática, interação hidrofóbica ou interações por pontes de hidrogênio. As interações hidrofóbicas constituem as mais fortes devido à penetração do polímero nas bicamadas. Dependendo das interações envolvidas, podem ocorrer interações que promovam a uma separação ou não de fases. A separação completa de fases é indesejável, pois ocorre a insolubilização completa do complexo polímero-vesícula, dificultando o controle de tamanho e aplicações.

Antunes et al (2009) também compara a interação do DNA com a vesícula lipossomal catiônica como um tipo de interação polímero e vesícula. Sendo inclusive um dos sistemas mais estudados na literatura devido seu potencial para “*gene delivery*”. O entanto a comparação das interações entre o polímero-vesículas lipídicas e vesículas- DNA, existe uma grande diferença comportamental entre os polímeros e suas estruturas. O DNA apresenta-se enovelado em meio aquoso e quando interage com as vesículas, ocorre sua condensação e retenção no interior dos lipossomas (Rädler et al. 1997). Este comportamento pode ser verificado no trabalho de La Torre (2009), o qual verifica que a complexação eletrostática entre lipossomas catiônicos e DNA (em razões molares de carga apropriadas) com potencial zeta equivalente ao dos lipossomas catiônicos (sem a presença do DNA). Como o AH apresenta a capacidade de se expandir em meio

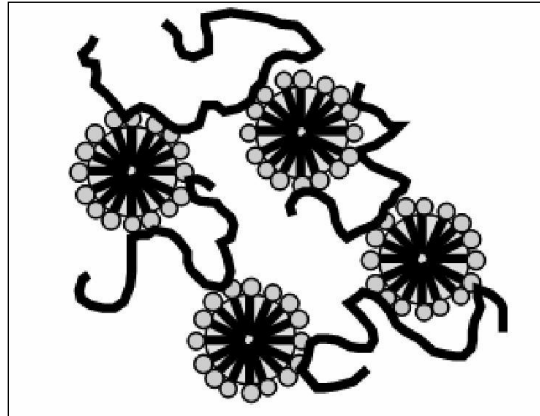
aquoso, além da diferença de massa molar (quando comparado ao DNA), sua interação com os lipossomas gera provavelmente estruturas diferenciadas do caso anterior.

A interação entre surfactantes e polímeros naturais exerce grande influência nas propriedades reológicas, interfaciais e espectroscópicas dos sistemas onde estão inseridos, alterando as características macroscópicas do sistema e conseqüentemente refletindo em sua aplicação (MYERS, 1999). Além disso, as interações polímero-surfactante podem ocorrer entre as moléculas individuais de surfactante e a cadeia polimérica ou na forma de agregados complexos de polímero-surfactante. Uma representação esquemática deste tipo de interação é apresentado na (FIGURA 2).



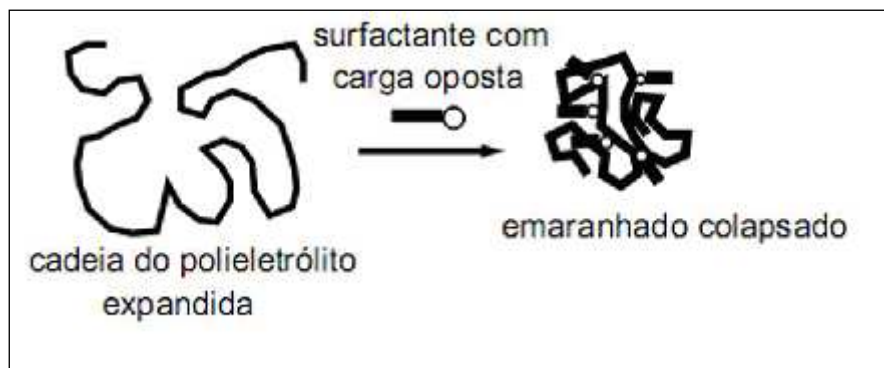
**FIGURA 2: Diagrama esquemático apresentando as interações entre surfactante agregado em micelas e ao polímero (Fonte: Myers, 1999)**

Alternativamente, as micelas ou agregados formados pelo surfactante, podem atuar como sítios para adsorção do polímero (FIGURA 3), inferindo estabilidade ao sistema. Quando presentes, estas estruturas tem um potencial em maior extensão para alterar a reologia do sistema, do que quando as moléculas adsorvidas estão isoladas ligando as cadeias de polímero (Myers, 1999).



**FIGURA 3: Figura esquemática representando a agregação entre micelas e polímeros (Myers 1999).**

A interação é favorecida quando o polímero e o surfactante de cargas opostas estão presentes, compactando a configuração do polieletrólito (FIGURA 4). Normalmente este fenômeno reflete no decréscimo da viscosidade do sistema, aumento da tensão superficial, perda da solubilidade do polímero com possível precipitação.



**FIGURA 4 :Empacotamento devido atração eletrostática (Figura adaptada de Myers 1999).**

Villetti et al., (2004) examinaram a interação entre o polieletrólito hialuronato de sódio (hialuronato-Na) (com característica aniônica) e o surfactante catiônico brometo de deciltrimetilamonio (C10TAB) (de natureza catiônica). Através de experimentos de espalhamento de luz estático, os autores constataram a diminuição do raio de giro e do segundo coeficiente virial  $A_2$  como consequência

da compactação pelas interações eletrostáticas. Os mesmos autores, utilizando a técnica de espalhamento de luz, descreveram uma função de autocorrelação da interação polímero (hialuronato-Na)-surfactante (C10TAB) por três modos de relaxação: rápido, intermediário e lento, os quais correspondem a coeficientes de difusão maiores, intermediários e menores respectivamente. Para estes autores, estes modos de relaxação refletem a dinâmica das micelas livres (modo rápido), equilíbrio de associação/dissociação de agregados de surfactante (modo intermediário) e a adsorção polímero- micelas (modo lento).

Conforme La Mesa et al., (2004), interação entre polímero e surfactantes depende da temperatura, pH e força iônica e reflete nas as propriedades da mistura. Dependendo da concentração, carga, soluções moleculares, complexo polímero e surfactante, adsorção das vesículas ou micelas, pode-se observar a formação de géis, soluções líquidas e precipitados. Tal diversidade de fases resulta de um balanço entre forças eletrostáticas (repulsivas) e de Van der Waals (atrativas), dentre outras.

## **6. Associação entre ácido hialurônico e lipossomas catiônicos e sua aplicação na liberação de DNA**

O recobrimento das superfícies lipídicas com polieletrólitos e ligações covalentes com polieletrólitos tem sido uma estratégia promissora para formar nano cápsulas estáveis (Antunes et al 2009). Porém, atualmente, existem poucas publicações que reportam a utilização de agentes mucoadesivos, tal como os polissacarídeos com lipossomas para utilização de vacinas aplicadas pela rota intranasal (Chiou et al., 2009).

A quitosana também é um polissacarídeo que pode se associar aos lipossomas. Guo et al 2003, estudaram lipossomas recobertos como biopolímero quitosana de massa molar 1000 kDa. Os autores observaram que a adição de quitosana à temperatura 20° C, sob agitação por 2 horas, com concentrações de quitosana na faixa de 0,1 ; 0,2 0,5, 1% em volume equivalente de lipossoma permitiu a obtenção de partículas de 100 nm.

Lipossomas compostos por (EPC+Coolesterol) foram revestidos por polímeros (Eudragit S100) sensíveis a variações de pH por mistura simples para aplicação

gastrointestinal (Barea et al., 2010). Para estes sistemas foram realizados apenas testes de liberação sem testes *in vitro* ou *in vivo*.

Lipossomas de natureza mucoadesiva foram desenvolvidos para a imunização contra a gripe aviária pela rota nasal em frangos (Chiou et al., 2009). Neste caso, os antígenos provenientes do vírus inativado H5N3 foram encapsulados em lipossomas zwitteriônicos, compostos de fosfatidilcolina:colesterol (4:1). A característica mucoadesiva se deu com a adição dos polissacarídeos goma xantana, que possui manose em sua estrutura que funciona como receptor “tool like” ou tremella, extraído do fungo *Tremella fuciformis* –TreE e contém  $\beta$ -glucanas que exibem propriedades imunomoduladoras e induz respostas humoral e celular. Os autores demonstraram que a presença de polissacarídeos bioadesivos elevou a iminogenicidade dos lipossomas contendo o vírus inativado. Além disso, o efeito da viscosidade foi também investigado e os géis bioadesivos de menor viscosidade resultaram em maior produção de anticorpos quando comparados aos de maior viscosidade (Chiou et al., 2009).

Estudos de modificação de superfície de lipossomas (multilamelares e unilamelares) compostos por extrato de cérebro bovino purificado, rico em fosfatidilserina foram realizados com o ácido hialurônico, através do monitoramento do potencial zeta. Para isso, este biopolímero foi inicialmente depolimerizado por sonicação, para diminuição de sua massa molar. Os resultados mostraram a viabilidade do recobrimento destes lipossomas com o AH, formando complexos estáveis e com redução de permeabilidade de fármacos (Sagrístá et al., 2000). Infelizmente os autores não reportaram os diâmetros finais dos lipossomas modificados com AH.

Para o caso dos lipossomas catiônicos, o agente mucoadesivo mais adequado é o que apresenta característica aniônica, tal como o AH (em pH fisiológico). Neste pH o ácido hialurônico possui uma estrutura enovelada randômica, semiflexível que ocupa um grande domínio hidrodinâmico. Além disso, com o pH da solução igual a 7, todos os grupos carboxílicos estão ionizados, promovendo o aumento da atração eletrostática entre o ácido hialurônico e o lipídio catiônico. Porém em solução contendo NaCl, o sódio atua sobre as ligações de hidrogênio



entre as cadeiras de AH, desfazendo as e abrindo a estrutura enovelada do mesmo (Cowman et al 2005), impedindo a complexação com o lipossoma catiônico.

As principais preocupações da incorporação deste polissacarídeo nestes sistemas nanoparticulados contendo DNA se referem à estabilidade da bicamada lipídica, competição com o DNA pela ligação com sítios catiônicos dos lipossomas e a influência no processo de transfecção.

Quanto à estabilidade das bicamadas lipídicas, a interação entre o lipídeo catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e o ácido hialurônico (AH) foi estudada por Ionov et al. (2009), através da técnica de monocamadas de Langmuir. Neste estudo, os autores identificaram que o biopolímero AH interage com a interface da membrana formada por DODAB, possibilitando a estabilização das propriedades desta membrana.

Em termos da competição entre o ácido hialurônico e o DNA para a ligação eletrostática com os sítios catiônicos do vetor não viral, Ruponen et al. (2001) verificaram que como este polissacarídeo é fracamente carregado, não existe a possibilidade do AH promover a liberação do DNA do vetor não viral.

A última preocupação no desenvolvimento de sistemas contendo lipossomas catiônicos e AH para a veiculação de DNA está na influência deste mucopolissacarídeo na eficiência de transfecção. Ruponen et al. (2001) identificaram que o ácido hialurônico extracelular é capaz de ser internalizado juntamente com poliplexos e lipoplexos (DOPE/DOTAP) em células de tecido muscular, ocorrendo a modificação do tráfego intracelular, elevando a expressão gênica para estes tipos de nanopartículas.

Hornof et al. (2008) avaliaram a transfecção *in vitro* de poliplexos formados por PEI/DNA e recobertos com AH, para o desenvolvimento de sistemas não virais de liberação de DNA em superfície ocular. Neste estudo, o revestimento com HA de massa molar inferior a 10 kDa facilitou a incorporação destes complexos através dos receptores C D44 das células epiteliais da córnea e elevou a eficiência de transfecção, melhorando a estabilidade *in vitro* e *in vivo* e promovendo uma proteção estérica na superfície do poliplexo. Quando HA de massas molares

superiores e em maiores concentrações foram utilizados, observou-se a redução da estabilidade e também da eficiência de transfecção.

Liu et al. 2011, demonstrou que agregados formados de quitosana/lipossoma(DOPE/DOTAP)/DNA possuíam melhor eficiência de transfecção; e quanto maior a quantidade de quitosana, menor eram os tamanhos obtidos e maior o potencial zeta.

O efeito da massa molar pode influenciar nas propriedades biológicas das nanopartículas obtidas a partir da associação de polímeros com vesículas. Estudos realizados por Duceppe et al 2009, mostra que a utilização de partículas de quitosana (5 KDa) e ácido hialurônico (64 KDa) de baixa massa molar são mais vantajosas que de alta massa molar (quitosana de 213 KDa) para aplicação em sistemas carreadores de DNA em casos clínicos devido a solubilidade em pH fisiológico e tamanho obtidos. Aulton (2009) cita que McMartin e colaboradores em 1987 compilaram dados da literatura para mais de duas dúzias de substâncias, com massas molares abrangendo de 160 a 34000 Da. Sempre que possível, as comparações foram feitas entre a absorção pela via nasal em seres humanos e ratos. Todos os modelos mostraram efeitos similares, que a absorção sofre uma redução com o aumento da massa molar, e que substâncias com massa molar até 100 Da, tem absorção superior a 80%. Desta forma a massa molar do AH poderá influenciar sua absorção

## 7. Referências

ALMEIDA, A.J. H.O. ALPAR, Nasal delivery of vaccines, **J. Drug Target.** 3 (1996) 455–467.

ALPAR, H.O.; SOMAVARAPU, S.; ATUAH, K.N.; BRAMWELL, V.W. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, pp. 411 – 430, 2005.

ANDREWS, G.P; LAVERTY, T.; JONES, D. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery; **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, volume 71 2009 páginas 505 -518,

ANTUNES, F.E; MARQUES, E.F; MIGUEL, M.G; LINDMAN, B; **Polymer vesicle association** , Advances in Colloid and Interface Science, 147-148- 2009, pp 18-35

AULTON, M, Delineamento de formas farmaceuticas segunda edicao, reimpressão 2008, artmed.

BAREA, M.J., JEKINGS, M.J, GABER,M.H, BRIDSON, R.H, Evaluation of liposomes coated with a pH responsive polymer, **International Journal of Pharmaceutics** v402, pp89-94.,2010

BROWN, M. B., JONES, S. A. Hyaluronic acid: unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **European Academy of Dermatology and Venereology JEADV**, vol. 19, p. 308-318, 2005.

CHIOU, CHWEI-JANG.A, LI-PING-TSENG, MING-CHUNG DENG C, PEI-RONG JIANG, SHANG LI TASI, TZE-WEN CHUNG, YI-YOU HUANG DER-ZEN LIU D. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. **Biomaterials**, v. 30, p. 5862–5868, 2009

CONE, R.A. Barrier properties of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, pp. 75–85, 2009.

COWMAN. M.K; MATSUOKA, S.; Experimental approaches to hyaluronan structure, **Carbohydrate Research**, 340, 2005, 791-809

CSABA, N.; KOPING-HOGGARD, M.; FERNANDEZ-MEGIA, E.; NOVOA-CARBALLAL, R.; RIGUERA, R.; ALONSO, M.J., Ionically crosslinked chitosan nanoparticles as gene delivery systems: Effect of pegylation degree on in vitro and in vivo gene transfer, **J. Biomed. Nanotech.**, v. 5, p. 162-171, 2009.

DAVIS SS. Nasal vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, pp. 21—42, 2001.

DE ROSA, G.; LA ROTONDA, M. I. Nano and Microtechnologies for the Delivery of Oligonucleotides with Gene Silencing Properties. **Molecules**, v.14, p.2801-2823, 2009.

DNDi/Drugs for Neglected Diseases initiative,

<[http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas\\_negligenciadas.aspx](http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx), 2008.>

DUCEPPE, N.; TABRIZIAN, M. Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, pp. 2625–2631, 2009.

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.

FAASSEN, A. E., SCHRAGER, J. A., Klein, D. J., OEGEMA, T. R., COUCHMAN, J. R., & McCarthy, J. B. (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. **The Journal of Cell Biology**, 116, 521–531.

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.

GUO, J, PING, Q; JIANG, G.; HUANG, L.; TONG, Y.; Chitosan –coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide; **International Journal of Pharmaceutics** , V 260, 2003, p 167- 173

HASCALL, V. C., LAURENT, T.C. Hyaluronan: Structure and physical properties. Disponível em:  
<<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>  
[Acesso em 16/07/2009](#)

HENKE, C. A., ROONGTA, U., MICKELSON, D. J., KNUSTSON, J. R., & McCarthy, J. B. (1996). CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. **The Journal of Clinical Investigation**, 97, 2541–2552.

HORNOF, M.; FUENT, M; HALLIKAINEN, M.; TAMMI, R.; URTTI, A.; **Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD<sub>44</sub> receptor mediated uptake in human corneal**

**epithelial cells**, The Journal of gene medicine, 2008 volume 10, página 70-80

HORVÁT, S, FEHER, A; WOLBURG H, SIPOS P; VESZELKA. S.; TÓTH, <sup>a</sup>; KIS., L.; KURUNCZI.A; BALOGH,G;KÜRTI, L.; ERÖS, I.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; DELI, M.A; Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue; **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** volume 72, 2009, paginas 252 a 259

ILLUM, L.; FARRAJ, N.F.; FISHER, A.N.; GILL,I.; MIGUELITA,M.; BENEDETTI, L.M.. Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 29, p. 133-141, 1994.

IONOV, R.; EL-ABED, A.; GOLDMANN, M. Structural organisation of cationic dioctadecyldimethylammonium bromide monolayers in presence of hyaluronic acid. **Eur Biophys J.**, v. 38, p. 229–235, 2009.

KHARENKO, E.A.; LARIONOVA, N. I. ; DEMINA, N. B. Mucoadhesive drug delivery systems (review) **Pharmaceutical Chemistry Journal Vol. 43, No. 4, 2009**

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, p. 979-984, 1984.

LABAS, R.; BEILVERT, F.; BARTEAU, B.; DAVID, S.; CHE`VRE, R.; PITARD, B. Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. **Genetica**, v.138, p. 153–168, 2010.

LAI, S.K.; WANG, Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, pp. 158–171, 2009.

LA MESA, C; POLYMER SURFACTANT AND PROTEIN SURFACTANT INTERACTIONS, *Journal of Colloid and Interface Science* 186(205) p 148-157,

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.

LAURENT, T. C., FRASER, J. R. E. Hyaluronan. *FASEB Journal.*, vol. 6, p. 2397-2404, 1992.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. Editora Saraiva, SP, p. 219, 1988.

LETHEM, M.I. The role of tracheobronchial mucus in drug administration to the airways, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 11, pp. 271–298, 1993.

LIAO, Y,H, S.A. JONES, B. FORBES, G.P.MARTIN, M.B. BROWN, Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery, *Drug Deliv.* 12 (2005) 327–342.

LIM, S.T, G.P. MARTIN, D.J. BERRY, M.B. BROWN, Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, *J. Control. Release* 66 (2000) 281–292.

LIU, R.; GAN, L.; YANG, X.; XU, H.; Chitosan as a condensing agent induces high gene transfection efficiency and low cytotoxicity of liposome, **Journal of Bioscience and bioengineering** Vol 11 No 1, 98-103, 2011

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 57 (2005) 1595–1639.

MÉNDEZ, S.; BELKAID, Y.; SEDER, R.A. & SACKS D. (2002). Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine.** 20(31-32): 3702-3708.

MYERS, Drew; **Surfaces, interfaces, and colloids, principles and applications**, Second Edition, Wiley VCH

NAOR, D., NEDVETZKI, S., & GOLAN, I. (2002). CD44 in cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 39, 527–579.

NAOR, D., SIONOV, R. V., & ISH-SHALOM, D. (1997). CD44: Structure, function, and association with the malignant process. **Advances in Cancer Research**, 71, 241–319.

PARTIDOS, C.D. Intranasal vaccines: forthcoming challenges. **Pharm Sci Technol Today**, v.3, pp. 273—80, 2000.

PEDROSO DE LIMA, M.C.; NEVES, S.; FILIPE, A.; DÜZGÜNES, SIMÕES, S. Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Current Medicinal Chemistry*, v. 10, pp. 1221-1231, 2003.

PEPPAS, N.A.; SHALIN, J.J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v.17, pp. 1553-1561, 1996.



PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. **Vaccine**, v. 19, p. 3301-3310, 2001.

PINTO, E.F.; PINHEIRO, R.O.; RAYOL, A.; LARRAGA, V.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal Vaccination against Cutaneous Leishmaniasis with a Particulated Leishmanial Antigen or DNA Encoding LACK. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 72, p. 4521–4527, 2004.

PRESTWICH, G.D, K.P. Vercruyse, Therapeutic application of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives, **Pharm. Sci. Technol. Today** 1 (1998) 42–43.

PRITCHARD, K.; LANSLEY, A.B.; MARTIN, G.P.; HELLIWELL, M.; MARRIOT, C.; BENEDETTI, L.. Evaluation of the hyaluronan derivatives: detachment weight and mucociliary transport rate studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 137-145, 1996.

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.

ROMAGNOLI, M.; BELMONTESI, M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 123-159, 2008.

ROSADA, R.S., TORRE, L.G.; FRANTZ, F.G. et al. Protection Against Tuberculosis by a Single Intranasal Administration of DNA-hsp65 Vaccine Complexed with Cationic Liposomes **BMC Immunology** 9:38, 2008. Artigo altamente acessado / Fator de impacto 2.67

RUPONEN, M.; YLÄ-HERTTUALA, S.; URTTI, A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1415, p. 331-341, 1999.

SAGRISTÁ, M.L; MORA, M. and MADARIAGA, M.A; SURFACE MODIFIED LIPOSOMES BY COATING WITH CHARGED HYDROPHILIC MOLECULES; CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS VOLUME 5, 2000, PP 19 –33

SANDERS, N.; RUDOLPH, C.; BRAECKMANS, K.; SMEDT, S.C.; DEMEESTER, J. Extracellular barriers in respiratory gene therapy, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61 , pp. 115–127, 2009.

TORRE, L. G., Desenvolvimento de vacina gênica veiculada em adjuvantes lipídicos para tratamento da tuberculose. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. 2006.

TORRE, L.G., SANTANA, M.H.A., ROSADA, R.S., COELHO-CASTELO, A.A.M.; SILVA, C.L. **Configuração lipossomal funcional e processo de obtenção de configuração lipossomal funcional**. Patente Brasileira PI 0705630-3, 2007.

TORRE, L.G.; SANTANA, M.H.A.; ROSADA, R.S.; COELHO-CASTELO, A.A.M.; SILVA, C.L. **Processo de produção de vacina gênica lipossomal, vacina genica lipossomal e uso da mesma**. Certificado de adição: C1 0705630-3, protocolo INPI 220803492690, 2008.

TORRE LG, SANTANA MHA, ROSADA RS, COELHO-CASTELO AAM E SILVA CL. **Functional Liposomal configuration and method for obtaining said functional liposomal configuration.** Patente Internacioanl PCT/BR2008/000387. Depositada em 12/12/2008.

TORRE, L. G.; ROSADA, R.S.; TROMBONE, A.P.F., FRANTZ, F.G.; COELHO-CASTELO, A.A.M., SILVA, C.L.; SANTANA, M.H.A. Synergy between structural stability and dna-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE vesicles and DOTAP/DOPE lipoplexes. **Colloids and Surfaces**, v.73, p. 175-184, 2009.

TUR, K.M.; CH`NG, H. Evaluation os possible mechanism(s) of bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, pp. 651-74, 1998.

UGWOKE M.I. R.U. AGU, N. VERBEK, R. KINGET, Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 57 (2005) 1640–1665.

VILLETTI, M. A. *et al.* Static and dynamic light scattering of polyelectrolyte/surfactant solutions: the Na-Hyaluronate/(C10TAB) system. **Macromol. Chem. Phys**, v. 205, 907–917, 2004.

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.

WROBEL, I.; COLLINS, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1235, p. 296-304, 1995.

*Capítulo 2*

ZHOU A,S, Shigeru Kawakami a, Fumiyoshi Yamashita a, Mitsuru Hashida.  
Intranasal administration of CpG DNA lipoplex prevents pulmonary  
metastasis in mice Cancer Letters 287 (2010) 75–81

---

## CAPÍTULO 3 – ASSOCIATION BETWEEN CATIONIC LIPOSOMES AND HYALURONIC ACID OF LOW MOLECULAR WEIGHT

---

Gabriela de Sá Cavalcanti Corrêa<sup>a</sup>, Mayra Martínez<sup>b</sup>, Denis Cantú Lozano<sup>b</sup>; Thais de Paula Rigoletto<sup>c</sup>, Maria Elisabete Darbello Zaniquelli<sup>d</sup>, Lucimara Gaziola de la Torre<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, CP 6066, 13083-970 Campinas, SP, Brazil*

<sup>b</sup>Instituto Tecnológico de Orizaba, México

<sup>c</sup>Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino-UNIFAE, 13870-377 São João da Boa Vista, SP, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

\*Corresponding author: [latorre@feq.unicamp.br](mailto:latorre@feq.unicamp.br)

*To be submitted to Journal of Colloids and Interface Science*

### 1. Abstract

The association between low molecular weight hyaluronic acid (HA) and cationic liposomes (egg phosphatidylcholine - EPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine - DOPE and the 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane - DOTAP) was investigated. We evaluated the effect of liposome size (extruded/unilamellar and dehydrated-rehydrated liposomes/multilamellar) and HA molecular weight (6 and 16 kDa). The cationic liposomes/HA complexes were evaluated regarding their physico-chemical properties: average diameter, zeta potential, phase transition (differential scanning calorimetry) and morphology (transmission electronic microscopy). Moreover, the intermolecular interaction at the air/liquid interface was assessed from lipid Langmuir monolayers formed on HA subphase. Pronounced effects on the physico-chemical properties and morphology of the liposomes were observed in

function of liposome aggregation (extruded or DRV) and HA molecular weight. HA 16kDa was efficient in coating extruded liposomes furnishing complex particles with average diameter of about 300-400 nm. The monolayer/bilayer stability is decreased in the presence of HA (more intense effect for HA 16kDa), also confirmed by the decrease in melting temperature. Therefore, HA-cationic liposome complexes preparation, useful for the development of new strategies in gene or intracellular delivery, was described. Moreover, the comprehensive analysis of results has improved the understanding of HA-cationic liposome interaction.

**Keywords:** Hyaluronic acid, Liposome, Langmuir monolayer, Plasmid DNA, Gene delivery

## 2. Introduction

Liposomes have been widely investigated in the cosmetic, pharmaceutical and food fields as drug delivery vehicles for several decades, offering control of drug release (Torchilin, 2005, Mozafari et al., 2008,). Liposomes are colloidal aggregates composed by amphiphilic lipids that in excess of water self-assembly in vesicles containing an inner aqueous core (Lasic, 1997, New, 1990). The advancement in the fields of gene therapy and nucleic acid delivery (Spink & Geddes, 2004, Seregin & Amalfitano, 2011, Hedman et al. 2011) has led scientists to develop cationic carriers for specific delivery inside cells (Guo & Huang, 2012). Among myriad of cationic nanoparticles, cationic liposomes emerges as a promising strategy for nucleic acid delivery (Kapoor et al., 2012, de Lima et al., 2001, Felgner et al., 1987).

Nevertheless, when cationic liposomes are employed the driving force for intracellular delivery is electrostatic since cellular membranes present anionic

characteristics. In this case, the nucleic acid delivery into cells will occur without specific targeting and the cationic liposome/ nucleic acid complex can be delivered in different organ or cells (Hashida et al., 2002, Gao & Huang, 1995). In order to gain selectivity in cell delivery, different strategies can be employed by coupling molecules that specific interacts with receptors in cell membranes. One example is the electrostatic coating of poly(ethylenimine) (PEI)/pDNA complexes with folic acid (FA) to decreased the nanoparticle cytotoxicity and also to explore the FA-specific receptor (FR) in melanoma cell line (B16-F10 cells) (Kurosaki et al., 2011).

In this context, the association between hyaluronic acid (HA) and cationic liposomes can offer an important strategy in cell targeting. HA is a biopolymer that naturally occurs in living organisms. Different properties confer an unique importance to this biopolymer such as natural mucobioadhesion, biocompatibility (Brown & Jones, 2005, Kuo, 2006). It also plays an important role in cell signaling via CD44 and RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility,CD168) (Hornof et al, 2008, Naor et al., 2002; Naor et al., 1997) and HA receptors (CD44) are expressed in different tumors and stem cells (Eliaz et al., 2004, Rudzki et al., 1997, Herrera et al., 2007). The coupling of HA on the surface of liposomes can be accomplished by two routes, chemical derivatization of molecules to incorporate HA and cationic nanoparticle coating with HA.

In the field of liposomes, chemical derivatization can be obtained by covalently coupling HA molecule on the lipid polar headgroup. The liposomes-HA chemical conjugates can be produced according conventional procedures for liposome production. Hyaluronic acid -dioleoylphosphatidylethanolamine (HA-DOPE) chemical conjugate was successfully used to produce cationic liposomes ([2-(2,3-

didodecyloxypropyl)hydroxyethyl]ammonium bromide (DE) and HA-DOPE) to delivery plasmid DNA pCMV-luc (Surace et al., 2009 and Taetz et al, 2009). Lipoplexes containing HA-DOPE were efficient in delivering the plasmid DNA in CD44 expressing cell lines in culture. Qhattal & Liu (2011) produced HA-liposome chemically conjugated after liposome preparation, chemically conjugating HA with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-hydroxysulfosuccinamide (NHSS). The HA-liposome cell uptake correlated with HA molecular weight ( $5-8 < 10-12 < 175-350$  kDa), among other parameters.

The electrostatic interaction between cationic liposomes and HA can be used to the development of surface-modified liposomes. It is noteworthy that few studies focused the electrostatic interaction between HA and cationic liposomes, aiming at the formation of HA-coated liposomes. Sagristá et al. (2000) investigated the surface modified liposomes by coating with HA. The authors demonstrated the ability of HA-coated liposomes to hold encapsulated drugs. Esposito et al. 2008 reported the proof of concept of cationic liposomes functionalized with HA ( $10^3-10^4$  kDa) and loaded with magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent. According the authors the non covalent rout is straightforward and simple, however the final complex size depends on HA concentration. HA-liposome complexes presented affinity for cells (C6 line, that express high levels of the CD44 receptor) and the simple electrostatic interactions produced an efficient and specific contrast agent for MRI, with cell targeting and low toxicity.

The electrostatic complexation between cationic liposomes and HA can be considered as polymer-vesicle system and the investigation of this colloidal behavior



are important for further *in vivo* or *in vitro* applications (Antunes et al., 2009). Mutual interactions, such as electrostatic bridging, hydrophobic and hydrogen-bond interactions control the polymer-vesicle association, leading to segregative or associative systems (Wang & Tam, 2004). Besides the promising results in complexing cationic liposomes and HA, systematic studies regarding the effect of HA molecular mass and cationic liposome size is necessary in order to fully understand the mechanism of electrostatic interactions.

Our research group studied liposomes composed by the lipids egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) to delivery DNAhsp65 plasmid as a single dose tuberculosis vaccine via intranasal administration (Rosada et al., 2008, de la Torre et al., 2009). Recently, a nuclear localization signal peptide for nuclear targeting was incorporated into de liposome structure for *in vivo* tuberculosis treatment (Rosada et al., 2012) and *in vitro* evaluated in HeLa cells transfections (Balbino et al. 2012). The possibility of including specific targeting in EPC/DOTAP/DOPE liposomes can be an important strategy for further developments in tuberculosis vaccine and treatment.

In this work we investigate the association between cationic liposomes (EPC/DOTAP/DOPE) and HA. We evaluated the influence of hyaluronic acid molecular weight and liposome configuration (extruded or dehydrated-rehydrated) on the final physico-chemical properties, aiming at the understanding of the main parameters that govern the association of cationic liposomes and HA, for future development of new strategies for drug and gene delivery.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Materials:**

Sodium Hyaluronate (HA) of 6 and 16 kDa were purchased from Lifecore. The lipids egg phosphatidylcholine (EPC) (96% of purity), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (99.8% of purity) and the 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) (98% of purity) were purchased from Lipoid and used without further purification. Water was purified by Milli-Q-plus™, deionized until resistivity of 18.2 MΩ cm and filtered (0.22 μm). All chemicals were USP grade.

#### **3.2. Methods**

##### **3.2.1. Liposome preparation and complexation with HA**

###### **3.2.1.1. Extruded Cationic liposome (ECL) and Dehydrated and rehydrated cationic liposome (DRV) preparation**

The cationic liposomes were prepared according to Bangham's method [33]. Briefly, the required amounts of all lipid stock solutions in chloroform (EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar) were mixed and dried to a thin film using a rotary evaporator in a 650 mmHg vacuum for 1 hour. The dried lipid film was hydrated at 16 mM with water at 30°C above its main phase transition temperature [29][30]. The liposomes were extruded through two stacked polycarbonate membranes (100 nm nominal pore) 15 times under nitrogen pressure of 12 kgf/cm<sup>2</sup>, generating ECLs.

ECLs were quickly frozen using liquid nitrogen and freeze dried during 24 hours. The rehydration was carried out in four steps using water (16mM), generating the DRV Liposomes.

### **3.2.1.2. Eletrostatic complexation between hyaluronic acid (HA) and liposome**

HA-ECL and HA-DRV complexes were obtained adding sodium hyaluronate solution 0.3% m/v in ECL or DRV dispersion in three steps under vortex in ice bath. The HA mass percentage was determined considering the mass relationship between HA and lipids.

We also calculated the molar charge ratio between the positive charges from cationic lipid and negative charges from HA (based on the monomer properties).

### **3.2.1.3. Average diameter and zeta potential**

The average hydrodynamic diameter and size distribution, for particles lower (nanoscale), were measured by means of the dynamic light scattering (DLS) technique, using Malvern, Zetasizer Nano ZS. The mean diameter and distribution of particle sizes were estimated by CONTIN algorithm analysis. We used the number-weighted average diameter given by the software of the equipment.

The zeta potential was measured in water, at the temperature of 25°C by using Zetasizer Nano ZS.

In the case of HA with 6 kDa the HA/ECL average diameter were measured by laser diffraction using HORIBA LA900. We used the average diameter per volume given by the software of the equipment.

### **3.2.1.4. Phase Transition**

The main phase temperature of ELC and ELC/HA were obtained through differential scanning calorimetry (DSC) model Q 2000 TA Instruments, with software Thermal Advantage. Analysis were performed according to the AOCS method Cj 1-94 (2009). Lyophilized samples ranged from 8.0 mg to 12.0 mg were heated at a rate of 10°C/min from -40 to 60 °C. Due to the fast heating temperature (10 °C/min), which

reduce accuracy, the thermograms and melting temperatures given should only be considered for a comparison between the samples.

### **3.2.1.5. Langmuir Monolayer measurements**

EPC/ EPC/DOTAP/DOPE (50:25:25 mol %) were prepared by spreading 50  $\mu\text{L}$  of 1 mM chloroform solutions over a pure water subphase or on HA aqueous solutions contained in a Langmuir trough (Insight, Brazil, total area of 216  $\text{cm}^2$ ), resulting in an initial zero surface pressure. About 10-15 min was allowed for surface pressure stabilization and solvent evaporation. The monolayers were then compressed by moving the lateral barriers at  $0.42 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  until the attainment of collapse. In order to study the interaction of HA with EPC/DOPE/DOTAP mixed monolayers, both isotherms on pure water and on different concentrations of HA solutions were recorded as a function of the average lipid molecular area. The experiments were performed at  $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , above the main phase transition of the lipids, using always fresh solution to avoid chemical modification. The isotherms were recorded at least in triplicate and the maximum experimental error was  $2 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ .

### **3.2.1.6. Morphology**

Transmission electron microscopy (TEM) and the negative staining method were used to visualize the morphology of the lipid structures. Carbon-coated 200 mesh copper grids with collodion (parloidin with solution of ammonium molybdate 2%) film were used. Each liposome preparation was diluted to 1 mM total lipid and then applied to the carbon grid. After incubation for 5 minutes at room temperature, the excess was blotted. We used the electronic microscopic model LEO 906 E, together the camera

MEGA VIEW III /Olympus and the software ITEM E 23082007/ Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

ECL/HA complexes were also observed by optical light microscopy (LEICA model DMLM. Images acquisition were performed using a CCD camera (Leica DFC 295) connected to digital image processing software (Leica QWIN V3) installed on a computer.

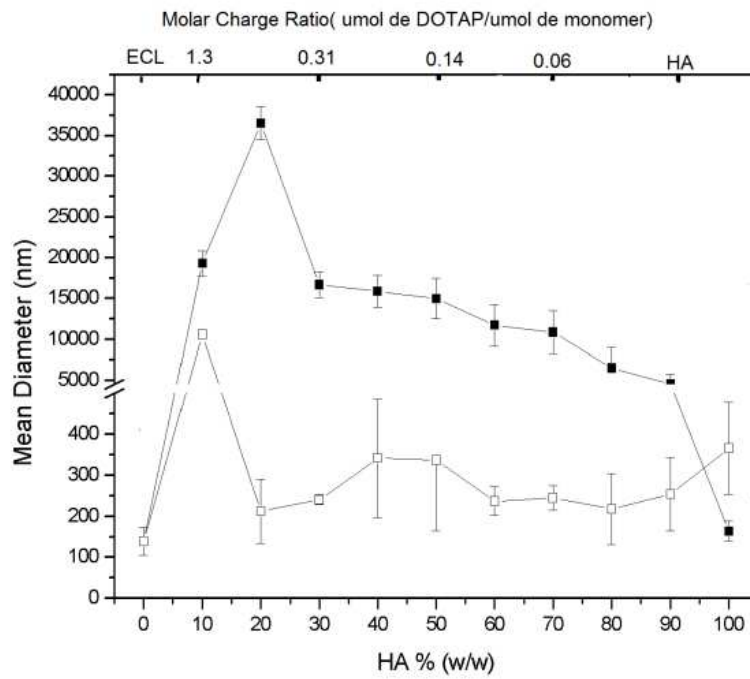
## **4. Results**

### **4.1. Physico-chemical properties of EPC/DOTAP/DOPE liposome/AH complexes**

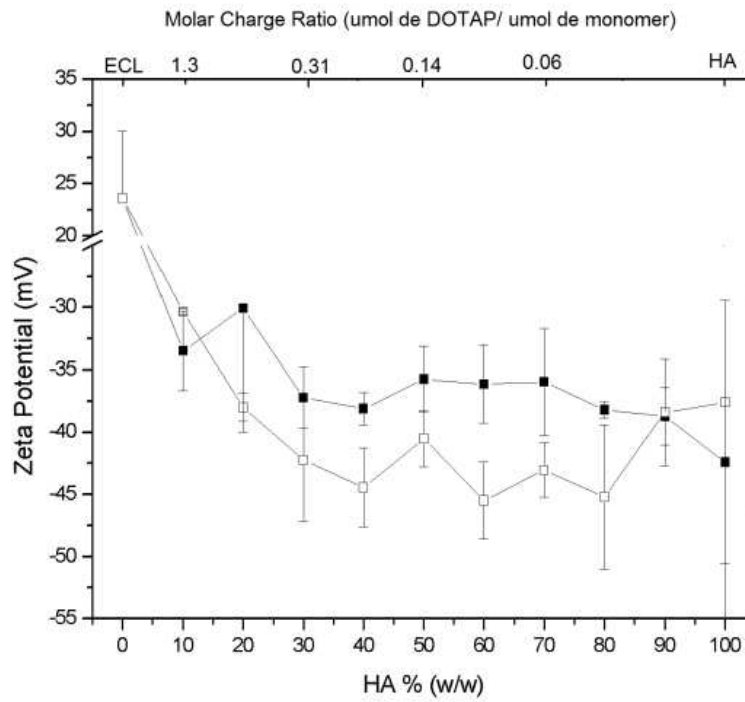
We investigated the influence of HA complexation with extruded cationic liposomes (ECL) and dehydrated hydrated liposomes (DRV). ECL was produced by the hydration of the dried film method, followed by extrusion and the average diameter and polydispersity was  $121 \pm 26$  and  $0.2 \pm 0.1$  respectively. The ECLs were freeze-dried and rehydrated to produce the DRVs and the average diameter and polydispersity were  $750 \pm 234$  and  $0.2 \pm 0.1$ , respectively.

The liposome/HA complexes were obtained at all combination (ECL or DRV and HA 6 or 16 kDa) and the average hydrodynamic diameter and zeta potential profiles as function of HA percentage or positive/negative molar charge ratio are presented in FIGURE 1.

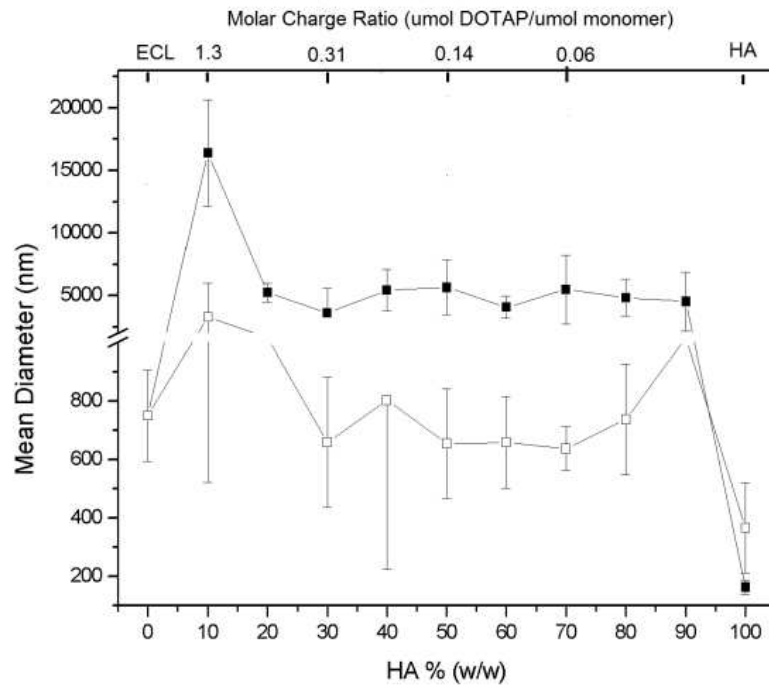
A



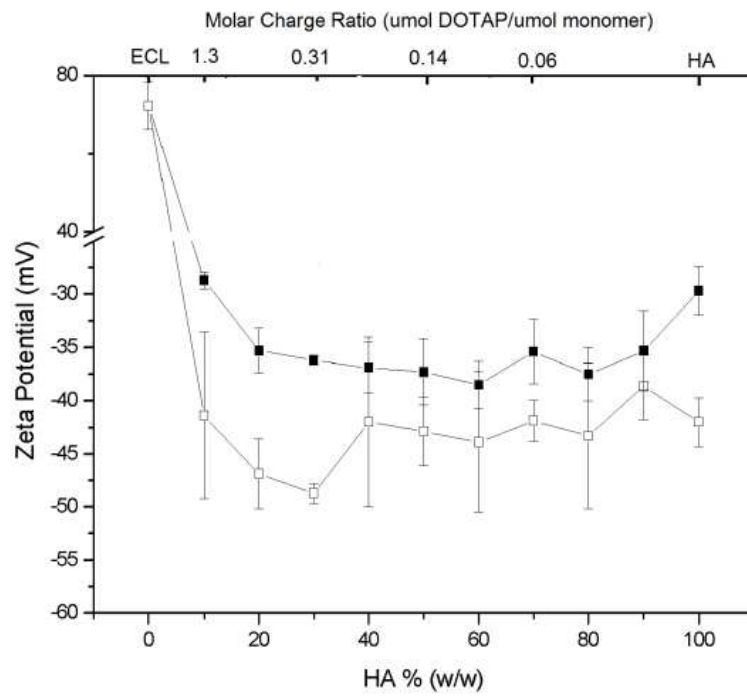
B



C



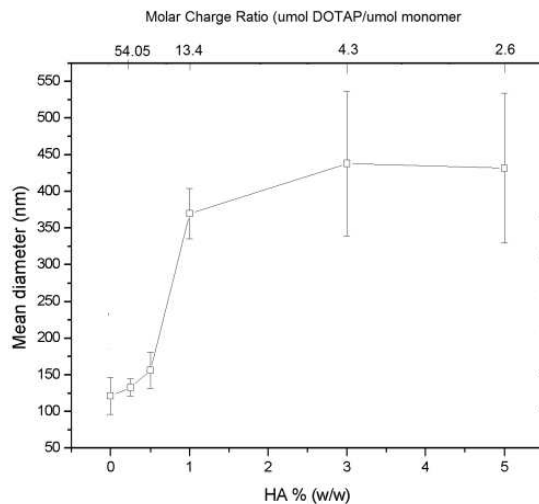
D



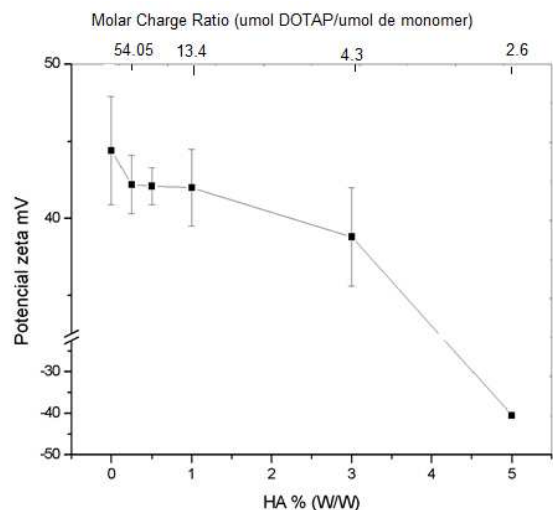
**FIGURE 1: Physico-chemical properties of complexes obtained after the association between HA and cationic liposomes at different HA content. Extruded liposomes (ECL)/HA complexes: A) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter); B) Zeta potential. DRV/HA complexes: C) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter); D) Zeta potential. Error bars correspond to SD of three independent experiments (n=3); HA of 6kDa (■) and 16 kDa(□).The lines are just to guide the eye.**

We can observe different hydrodynamic diameter profiles as function of HA molecular weight of the complexes (FIGURE 1). ECL/HA 16 kDa complexes presented diameter with approximately 400 nm for approximately all HA content (FIGURE 1A). However, when the same liposomes (ECL) were complexed with HA 6 kDa, we obtained larger aggregates than the complexes with 16kDa, with diameter ranging from 15 to 5  $\mu\text{m}$ , with the increase of HA percentage. This difference on average diameter profile suggests strong influence of the HA molecular weight when it is associated with ECL (FIGURE 1A). Considering the lower average diameter obtained for complexes with HA 16kDa, we evaluated the diameter and zeta potential profile at low HA % (FIGURE 2). We can observe that there is an increase in liposome size from aprox. 150 nm at HA 0.5% to 350 at 3%. The zeta potential crossed the positive to negative range in between 3 and 5% HA.

A



B





**FIGURE 2: Physico-chemical properties of complexes obtained after the association between HA 16kDa and extruded cationic liposomes (ECL). A) Average hydrodynamic diameter (number weighted average diameter ); B) Zeta potential. Error bars correspond to SD of three independent experiments (n=3).The lines are just to guide the eye.**

The association between DRV and HA presented different size range regarding the average hydrodynamic diameter when compared to ECLs (FIGURE 1C and D). DRV/HA-16kDa complexes presented mean hydrodynamic diameter with approximately of 700 nm (FIGURE 1 C) and DRV/HA 6kDa with aprox. 5  $\mu\text{m}$ . It is also possible to observe that complexes obtained with DRVs presented high standard deviation, indicating the difficulty in repeatability of this type of complexation, probably due to the high level of polydispersity index of DRVs. Besides the differences in diameter values, similar behavior was identified for ECLs and DRVs and complexes with lower diameter were obtained with HA of 16 than 6 kDa.

In all cases, we observed that when the HA concentration was close to 10-20% there was an increase in the diameter of the complexes. Curiously, this percentage of HA corresponds to the molar charge ratio close to isoneutrality (Molar Charge Ratio = 1).

ECL/HA and DRV/HA complexes in both HA molecular weight presented the same zeta potential profile (FIGURE 1B and D). These complexes presented positive values at HA concentration lower than  $\sim 10\%$  (Figure 1 B and D), suggesting that low amounts of this biopolymer can strongly change the surface properties of these complexes. FIGURE 2B shows the potential zeta for small amounts of HA 16kDa. The zeta potential became negative at HA concentration higher than  $\sim 5\%$ , suggesting liposome surface modification by HA. ECL/HA16kDa complexes presented isoneutrality properties in terms of zeta potential at only 5 to 6 % of HA (for both molecular weights) (FIGURE 1B) and it corresponds to the isoneutrality in terms of molar charge ratio.

In general, we can identify two different regions in the zeta potential profile (FIGURE 1 B and D). The first region with positive values presents low amount of HA (from 0 to  $\sim 10\%$  of HA) and the second one, at higher HA content, with negative zeta values.

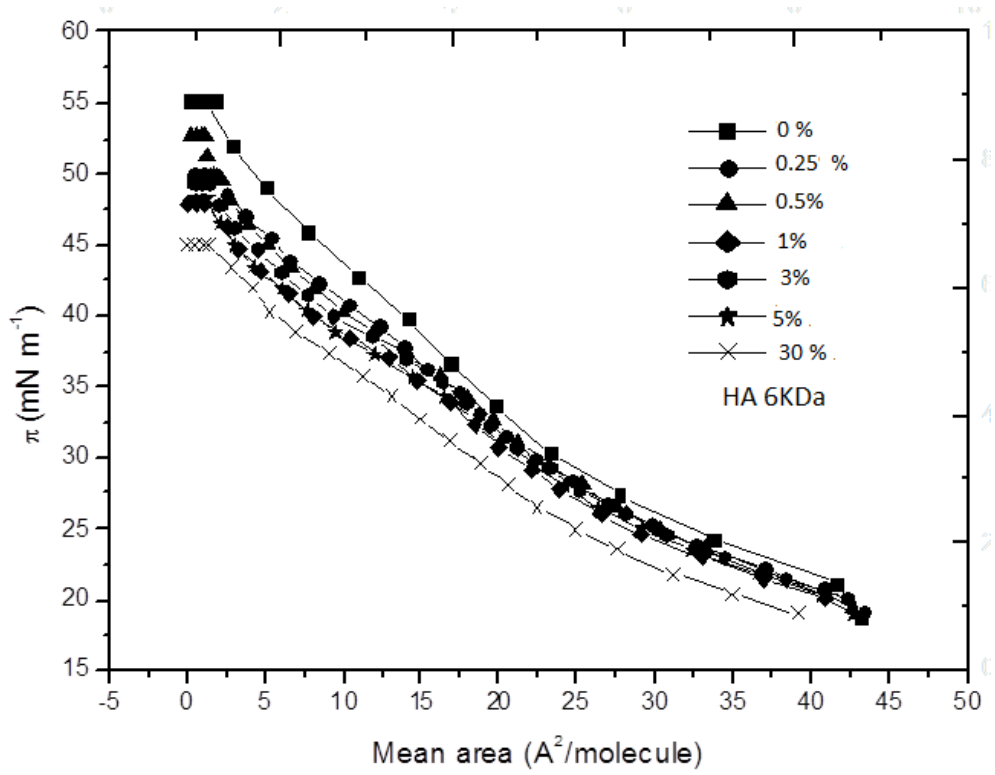
Considering the association between ECL and HA (16kDa) generated complexes with size in nanoscale (300 nm) and also lower standard deviations, the following investigations were carried out only with ECLs.

#### 4.2. Langmuir Monolayers of EPC/DOTAP/DOPE in presence of AH

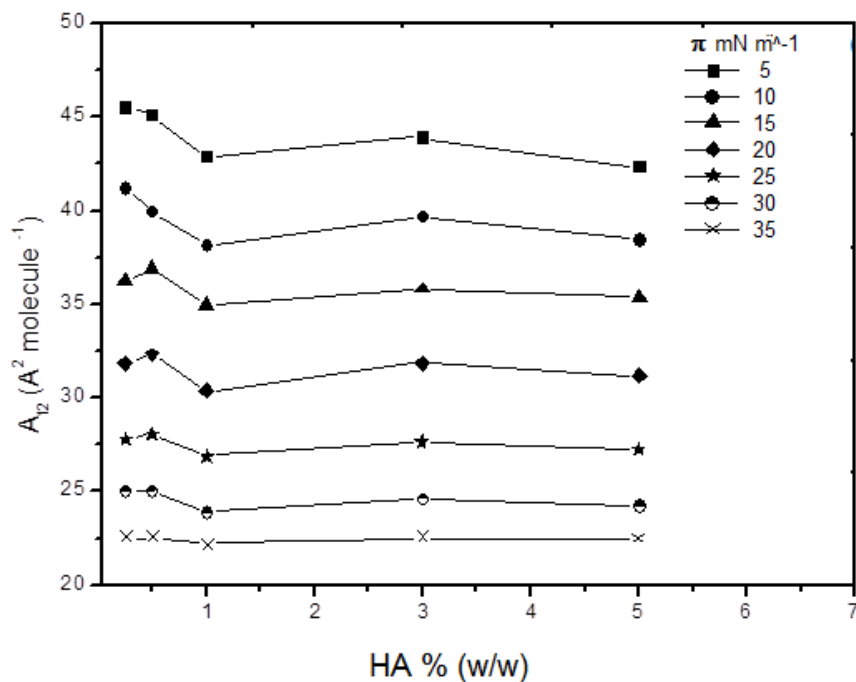
Studies using Langmuir monolayers were performed in order to get insights to better understand the differences in the association between ECL and HA of 6 and 16 kDa. We explored the influence of small amounts of HA, since the average size and zeta potential are strongly influenced by small quantities of HA. **FIGURE 3** presents the isotherms of EPC/DOTAP/DOPE monolayer at different percentages of HA 6kDa when added in the subphase. The profiles are characteristic of expanded liquids, without phase transitions (**FIGURE 3A**). The higher the HA 6 kDa percentage in the subphase the less expanded the isotherm is, suggesting strong interaction between HA and the monolayer. The collapse pressure varied from  $55.9 \text{ mNm}^{-1}$ , for EPC/DOTAP/DOPE without AH 6kDa to  $45.03 \text{ mNm}^{-1}$  with 30% of HA (

Table 1). We can also observe in Figure 3B that there is a slight decrease in the molecular surface area in the presence of 1% HA 6 kDa and at percentages higher than 1% there is no significant variation at pressures from 5 to 30  $\text{mNm}^{-1}$ . Additionally, we could not observe any molecular surface area modification as function of HA content at pressure of 35  $\text{mNm}^{-1}$  (**FIGURE 3B**).

A



B



**FIGURE 3 (A) Surface pressure–area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface with different hyaluronic acid 6 kDa. (B) Surface pressure–area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface, for a selected expanded molecular area from 15 to 60  $\text{Å}^2$ . The lines are just to guide the**

Table 1: Collapse pressure for monolayers composed by EPC/DOTAP/DOPE (50/25/25 % molar) containing hyaluronic acid (HA) in the sub-phase with two different molar weights and at different proportions.

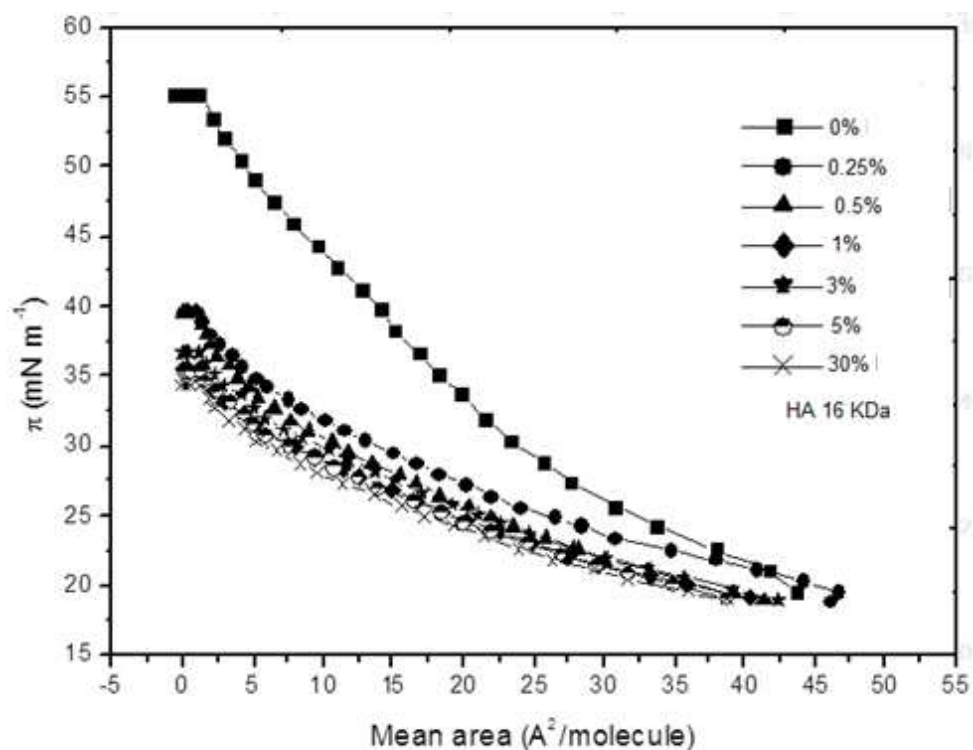
Monolayer composition	$\pi_{col}$ (Nm m <sup>-1</sup> )
EPC/DOTAP/DOPE	55.09
EPC/DOTAP/DOPE + HA 6kDa (%)	
0.25	49.95
0.5	52.74
1	47.87
3	49.35
5	48.20
30	45.03
EPC/DOTAP/DOPE + HA 16kDa (%)	
0.25	39.61
0.5	39.50
1	35.40
3	36.71
5	35.35
30	34.30

**FIGURE 4** presents similar monolayer studies, but using HA 16kDa. The profiles are similar for those observed for HA 6kDa (**FIGURE 3**). Collapse pressure varied from 39.09 mNm<sup>-1</sup>, for EPC/DOTAP/DOPE with 0.25 to 34.30 mNm<sup>-1</sup> (30% of HA) (

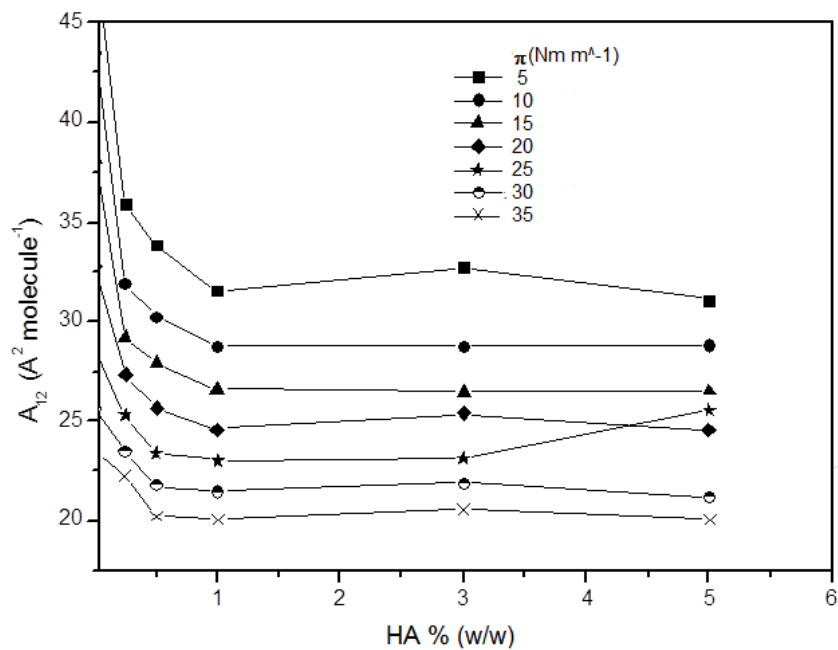
Table 1), demonstrating stronger HA 16kDa interaction with the monolayer than HA 6kDa. We can also observe in **FIGURE 3B** that there is an intense decrease in the molecular surface area when HA 16kDa is added until 1% and it is becoming constant at higher HA percentages (pressures of 5 to 30 mNm<sup>-1</sup>) (**FIGURE 4B**).

The decrease in the molecular surface area in the presence of HA 16 kDa was higher than for HA 6kDa (**FIGURE 3B** and 4A) and the same behavior was observed for the collapse pressure.

A



B

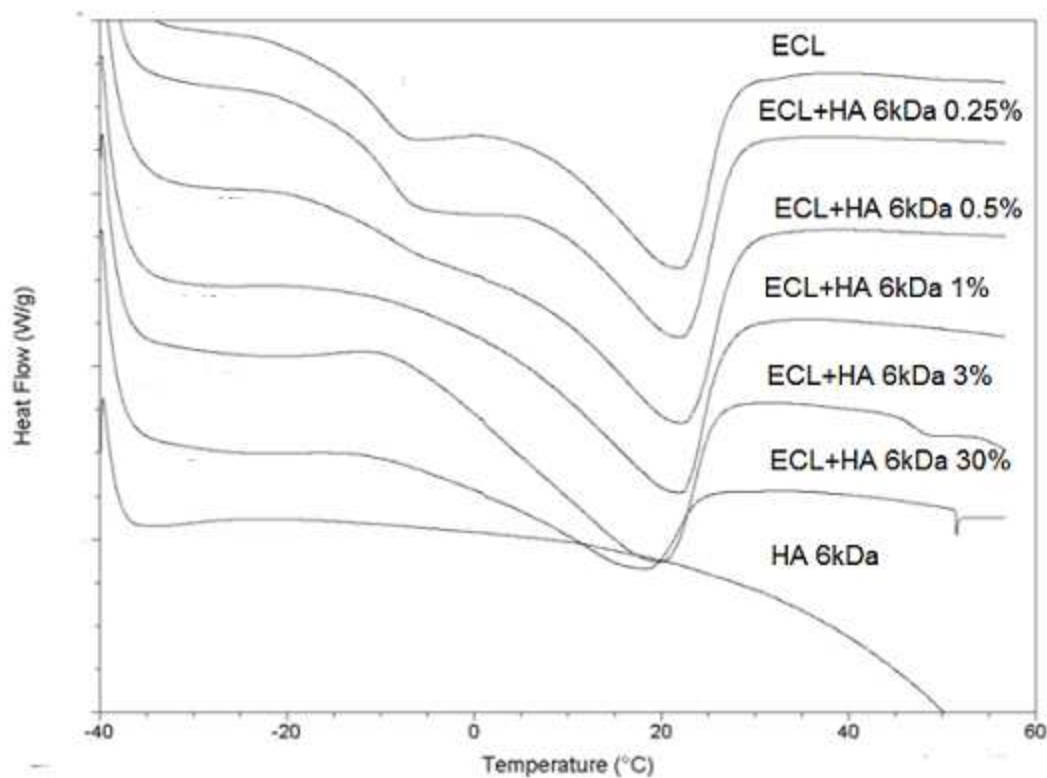


**FIGURE 4: (A) Surface pressure–area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayers formed at the air/water interface with different hyaluronic acid concentrations. The surface pressure–area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of EPC/DOTAP/DOPE mixed monolayer at the air/water interface, for a selected expanded molecular area from 15 to 60  $\text{\AA}^2$  are just to guide the eye.**

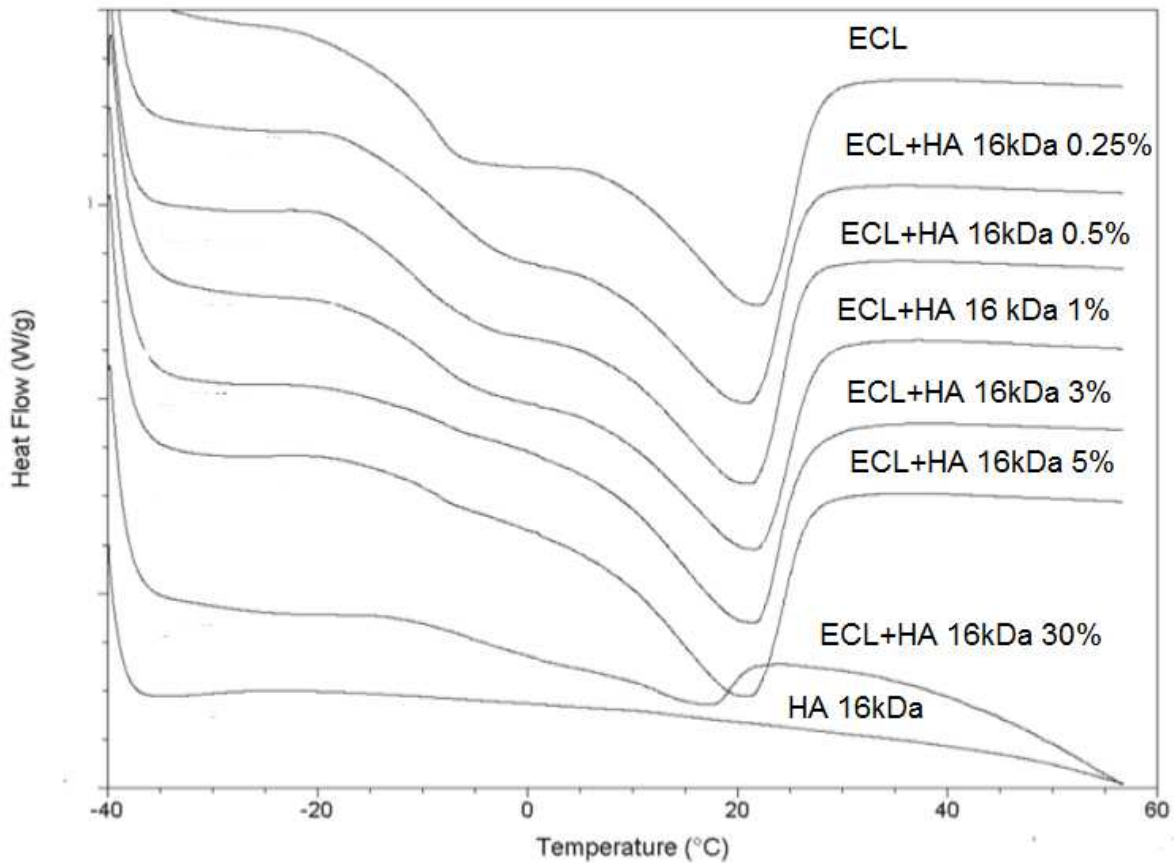


### 4.3. Phase transition

The main melting temperature was obtained for the ECL/HA (6 and 16kDa) complexes using differential scanning calorimetry, as presented in FIGURE 5 and FIGURE 6, respectively. The main melting temperatures are presented in Table 2.



**FIGURE 5:** Thermograms of for “empty” ECL and ECL/HA6kDa complexes at 0.25, 0.5; 1; 3 and 30% (w/w). Samples were freeze-dried and heated at 10 °C/min. Note: these thermograms are for comparison only as the fast heating temperature (10 °C/min) would reduce accuracy.



**FIGURE 6: Thermograms of “empty” ECL and and ECL/HA16kDa complexes at 0.25, 0.5; 1; 3, 5 and 30% (w/w). Samples were freeze-dried and heated at 10 °C/min. Note: these thermograms are for comparison only as the fast heating temperature (10 °C/min) would reduce accuracy**

The melting temperature ( $T_m$ ) for ECL was 29.3°C. In both HA molecular weight, the addition of 0.25% (w/w) caused the decrease in  $T_m$ , reaching 21.6 and 20.3°C for HA 6 and 16kDa, respectively. HA percentages in between 0.5 and 3 - 5% caused no significant change in  $T_m$ , suggesting that the increase in HA concentration does not influence the melting temperature (Table 2). However, when we increased the HA concentration to 30%, we observed a decrease in  $T_m$  for both HA molecular weights (Table 2).

We can also observe in Figures 5 and 6 that the HA presence changes the thermograms, since there is a modification in the peak width as the amount of HA is

increased. The thermograms for pure cationic liposome and for the systems with 0.5 and 0.5% of HA, a small peak is present next to temperature -10°C. This peak disappeared when HA concentration was higher than 0.50%.

We can also observe the presence of a small peak at 40-50°C in ECL/HA 6kDa at concentrations 3 and 30%, probably due to free HA .

**Table 2: Melting temperatures for “empty” ECL and ECL/HA complexes. Samples were freeze-dried and heated at 10 °C/min\*.**

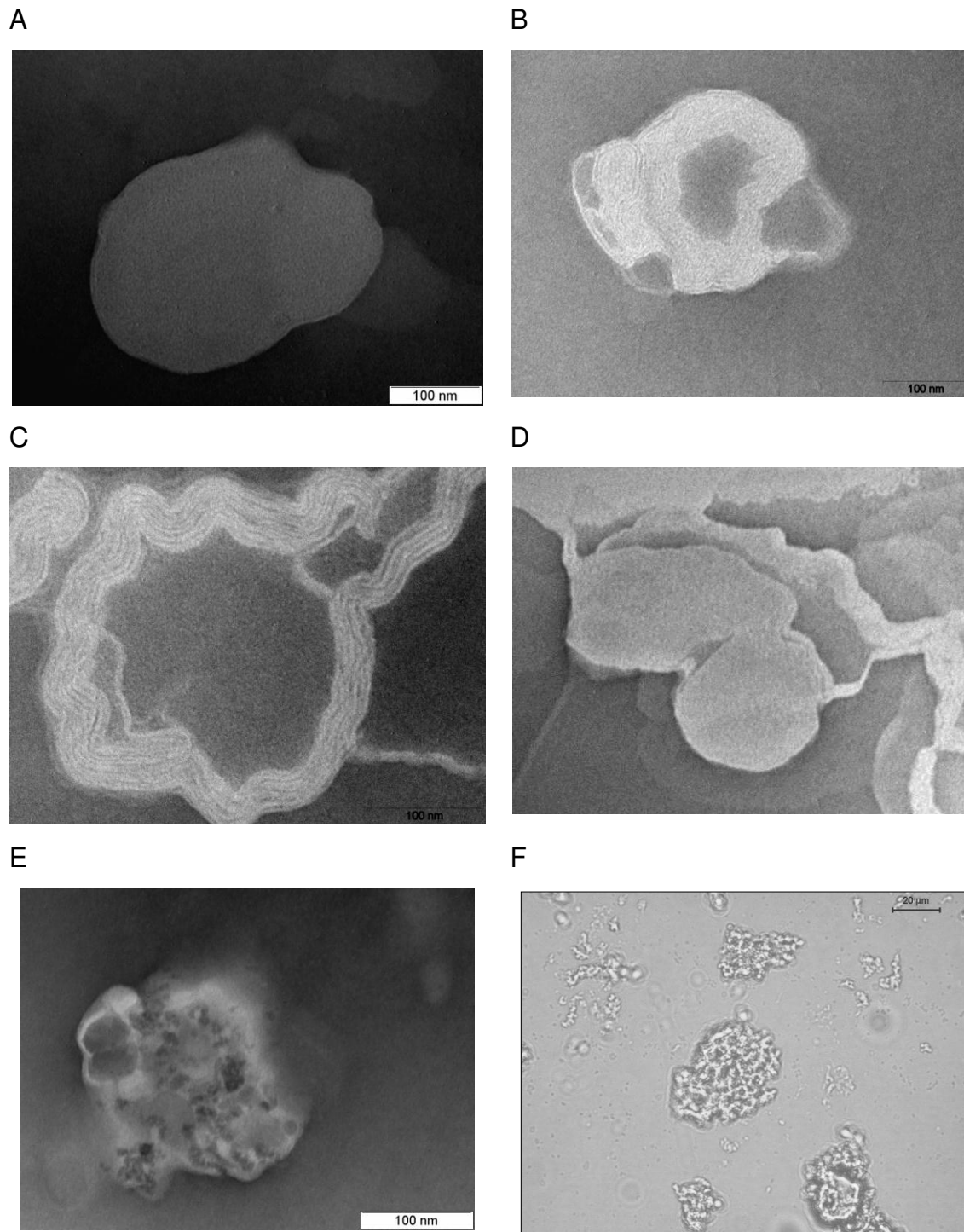
Liposome Configuration	Melting temperature (°C)	
“empty” ECL	29.3	
<i>ECLs + HA 6kDa</i>		
	0.25	21.6
	0.50	19.0
HA (%)		
	1	22.1
	3	21.8
	30	18.3
<i>ECLs + HA 16kDa</i>		
	0.25	20.3
	0.50	20.0
HA (%)		
	1	21.6
	3	20.9
	5	21.4
	30	17.2

\*Note: these values are for comparison only as the fast heating temperature (10 °C/min) would reduce accuracy.

#### **4.4. Morphology**

The morphology of ECL/HA (6 and 16KDa)/CL complexes was evaluated using transmission electron microscopy and negative staining (TEM) and optical microscopy, using ECL as control (FIGURE 7).

ECLs were prepared in water and presented spheroidal morphology (FIGURE 7A) similar as previously observed in Balbino et al.[32] that obtained the extruded liposomes in PBS buffer.



**FIGURE 7:Transmission electron micrographs of extruded cationic liposome (ECL) (A), ECL/HA 6kDa 0.25% (B), ECL/HA 16kDa 0.25%(C), ECL/HA 16kDa 1% (D), ECL//HA 16kDa 30% (E). Bars correspond to 200 nm (D), 100 nm (A,B,C,E). Optical micrograph for ECL/HA 6kDA 10% (F); Bar corresponds to 20 μm.**

When we added 0.25% HA (6 or 16 kDa) the ECL/HA complexes presented distinct morphology when compared to ECL (FIGURE 7 B and C), suggesting that the HA presence significantly alters the cationic liposome morphology. We can observe the presence of several layers on the liposomes surface, suggesting that the HA is well organized coating the liposomes (FIGURE 7B and C).

When the HA content was increased from 0.25 to 1%, we were able to observe only the complexes with 16 kDa (FIGURE 7 D) due to increase in size for ECL/HA 6 kDa complexes (FIGURE 1A). In this case we can observe different morphology from ECL (FIGURE 7A) and complexes with 0.25% HA (FIGURE 7 B and C). The presence of HA in 1% seems to be an excess concentration and we could not observe the organized HA coating the ECL (FIGURE 6 D). The excess of HA (16 kDa) at 30% shifts the liposome organization to a distinct one, with ECL incorporated into the HA structure.

Considering that HA (6 kDa)/CL complex presented large aggregates at HA content higher than 0.25%, we observed these aggregates with 10% of HA using optical microscopy (FIGURE 7 F). These microparticles were aggregates, probably in similar structure as observed in FIGURE 7 E (ECL/HA 16 kDa 30%).

## 5. Discussion

We investigated the electrostatic interaction between EPC/DOPE/DOTAP liposomes and sodium hyaluronate (HA) in order to get insights about the association of cationic liposomes and anionic biopolymers, for further applications in drug or gene delivery. Considering the previous studies involving EPC/DOTAP/DOPE liposomes as gene vaccine for tuberculosis treatment [31] and vaccination [29][30], and for *in vitro* delivery [32].

We selected HA as anionic biopolymer since it is nontoxic, biocompatible, mucoadhesive and can play an important role in cell signaling via CD44 and RHAMM [17][18][19].

We investigated the effect of polymer molecular weight (6 and 16kDa) and liposome size (ECL or DRV) on the final complex physico-chemical properties. Initially, we standardized the complexation protocol since variations in HA and liposome

concentration complete changes the final average diameter and zeta potential[26]. In our case, we carried out the HA complexation with cationic liposomes at 0.3%*m/v* and 16 mM in water, respectively.

The differences in liposomes size was investigated using ECL (approx. 100 nm) and DRV (approx. 700 nm). ECL has been already studied and characterized as unilamellar vesicles using Small Angle X Ray technique [32] and since DRV liposomes were produced without cryoprotectant, these aggregates were reported as multilamellar [34][35]. We observed that liposomes aggregation (uni or multilamellar) is an important parameter in the final liposome/HA complex (FIGURE 1A and C), suggesting the liposome integrity was maintained after HA complexation.

Pasquali-Ronchetti et al.[36] investigated the interaction between unilamellar and multilamellar vesicles (DPPC -1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) with HA with molecular weight ranging from 170-740 kDa. The complexation was carried out at 50°C (above DPPC melting temperature) and the suspension was mechanically stirred during 1 h to 4 days. The authors did not observe any difference in uni or multilamellar liposomes and using negative staining technique and electron microscopy. They demonstrated that after 48 hours there were no more isolated vesicles and the material was organized into a linear interconnected network of regular 12nm wide. We believe the differences between Pasquali-Ronchetti [36]and our study can probably be related to the HA molecular weight and complexation parameters. In our case, we used HA with molecular weight ~10 times lower than these authors and also the complexation parameters were different, since we carried out the complexation at 4°C (ice bath), using vortex as stirring. The presence of cationic lipid (DOTAP) is another important difference that allows the electrostatic interaction with HA.

Another evidence that HA molecular weight also plays an important role in the final physico-chemical properties is the evaluation of final complexes size. In the case of ECL/HA 6kDa, we obtained complexes with aprox. 20  $\mu\text{m}$  (10-12% HA) and the diameter decreased with increasing the HA concentration until 5  $\mu\text{m}$  (FIGURE 1A). Surprisingly, when HA 16 kDa was used, the final ECL/HA complexes presented diameter close to 200-400 nm in all range of HA concentration (FIGURE 1A and 2A). The differences in average diameter when comparing the HA molecular weight can

probably be result of better ECL coating by HA 16kDa, due to differences in HA rigidity as previously described by [37]. In this study, the authors reported that HA molecular rigidity (or stiffness) is related to the molecular weight and the lower this value the higher the rigidity is. In our case, the higher HA molecular weight (16kDa), with probably lower rigidity (when compared to HA 6kDa) presented lower size, enabling the production of complexes at 400 nm and negative zeta potential. This result suggests we can obtain HA 16kDa-coated liposomes with negative zeta potential.

Despite the variation of size from the complexes in terms of HA molecular weight, there was no significant differences in zeta potential profile as function of HA molecular. The differences related to HA molecular weight observed during complexation of cationic liposomes and HA were also identified in the Langmuir monolayer. In our previous study, Langmuir monolayers were evaluated using the same lipids and composition from this work. We observed the presence of attractive lipid interactions and the lipid miscibility was energetically favorable producing homogeneous and stable monolayers and aggregates [38]. The presence of HA in the subphase and using the same lipid monolayer suggests that there are significant interactions between the lipids and this biopolymer. In both HA molecular weights, there is a decrease in the molecular surface area with the increase in HA concentration (**FIGURE 3** and **FIGURE 4**), indicating that the presence of HA allows the lipids in the monolayer to be closer, probably due to electrostatic interactions between positive charges from DOTAP polar head group and negative charges from HA. The negative charges from HA carboxylic groups probably decrease the electrostatic repulsion from the cationic lipids from the monolayer. We also observed a decrease in  $\pi_{col}$  in the presence of HA, suggesting decrease of stability, since lower pressure is required for monolayer disruption. We observed pronounced decrease in  $\pi_{col}$  for HA 16kDa (



Table 1), probably due to lower HA molecular rigidity and probably higher electrostatic interaction with the monolayer, when compared to the HA 6 kDa.

Ionov et al.[39] investigated Langmuir monolayers of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and its interaction with HA 80kDa. In this case, the monolayer was stabilized by the presence of HA, increasing  $\pi_{col}$ . The differences from our results suggests that HA molecular weight is an important parameter on the association between liposomes and HA.

It is well known that the lipids monolayer properties can be related to the properties of a bilayer when the surface pressures are in the range of 30–35mNm<sup>-1</sup> [40]. In this case, if we observe that at 30-35 mN/m there is no significant effect in the molecular area (**FIGURE 3B**). On the other hand, HA 16kDa promoted intense decrease in molecular area at low concentration (<0.5%). Increasing the HA 16kDa to concentration higher than 0.5% we did not observe differences in the molecular area (**FIGURE 4B**). This effect can probably reflects the lower average diameter for ECL/HA 16kDa, when compared to the ECL/HA 6kDa (FIGURE 1). Probably HA rigidity may play an important role.

There is another important parameter to be evaluated in the Langmuir monolayers. The decrease in  $\pi_{col}$  with increasing the %HA (we observed decrease until 30%HA,

Table 1) can probably be consequence of interactions among different HA molecules. It is known that HA molecules present secondary and tertiary structures. The primary HA structure is the unbranched linear chain with the monosaccharides linked together (Laurent, 1970). The secondary structure is related to the hydrophobic faces formed by the axial hydrogen atoms and CH groups, allowing the formation of a tertiary structure as a result of molecular aggregation [41][15]. The electrostatic interaction between the monolayer and the first HA molecules can probably guide hydrophobic interactions among other HA molecules. We can extend this concept to the bilayers and explain HA complexation with ECL. When HA is in low concentration, there is probably a partial coating, organizing HA molecules on the liposome surface and enabling an organization among the HA molecules. This hypothesis was confirmed by transmission electron microscopy, where we can observe in FIGURE 7 B and C the formation of layers around the ECLs. This effect was pronounced with HA 16kDa, probably due to higher biopolymer flexibility.

DSC experiments were used in order to investigate the effect of HA on  $T_m$ . Liposome self-assembly is result of a balance between hydrophobic attractive forces (van der waals interactions) and repulsive forces from the polar head groups [42]. Modifications between these forces can modify the cooperative melting interactions, reflecting in  $T_m$  variations. We observed that  $T_m$  decreased from 29.3 to 20-21°C by adding small percentage of HA (0.25%) in the ECLs for both molecular weight (6 and 16kDa) (Table 2, Figures 5 and 6). Chapman & Urbina [43] investigated the influence of lipid-protein and lipid-polypeptide complexes. They concluded that the electrostatic interactions dramatically decrease  $T_m$  due to less efficient lipid packing as consequence of interactions between the charged lipid from the bilayer with charged groups in fixed positions in the proteins or polypeptides. In our case, we believe that similar lipid organization will change with the HA electrostatic interaction. The decrease in the main phase transition is consequence of the cationic polar headgroups from the lipid and the anionic carboxylic groups from HA in fixed positions.  $T_m$  decrease is more intense for HA 16kDa. These results are in accordance with Langmuir monolayer study, in which the monolayer is less stable for HA 16kDa (lower  $\pi_{col}$ ) (

Table 1).

## 6. Conclusion

We have studied the electrostatic complexation between cationic liposomes and hyaluronic acid (HA). HA Molecular weight (6 or 16kDa), liposome aggregation (extruded or dehydrated-rehydrated vesicles) play an important role on the final physico-chemical properties. The liposomes maintain the integrity, however the bilayer organization can be dramatically changed with the HA molecular weight and concentration. Ha 16kDa proved to be adequate in complexing extruded liposomes generating structures in the nanoscale range and negative zeta potential. These findings contribute to the understanding of cationic liposomes and hyaluronic interactions and also to the development of new strategies in gene or intracellular delivery.

## 7. References

- [1] TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews-Drug Discovery*, v. 4, pp. 147-160, 2005.
- [2] MOZAFARI, M.R.; REZA, M.; OHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, v. 18,p.309–327, 2008
- [3] LASIC, D.D. *Liposomes: From Physics to Applications*. Amsterdam:Elsevier Science Publishers B.V., 1993. 575 p.
- [4] NEW, R.R.C. 1990a. Preparation of Liposomes. In *Liposomes: A Practical Approach*,pp. 33–104. New, Oxford University Press, New York, NY.

- [5] SPINK, J & GEDDES, D. Gene Therapy Progress and Prospects: Bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment. *Gene Therapy*, v.11, pp. 1611–1616, 2004. doi:10.1038/sj.gt.3302354.
- [6] SEGERIN, SERGEY, S.; AMALFITANO, A . Gen Therapy for Lysosomal Storage Diseases: Progree, Challenges and Future Prospects. *Current pharmaceutical design*, v. 17/ 24 p. 2558-2574, 2011
- [7] HEDMAN, M.; HARTIKAINEN, J.; YLA-HERTTULA, S. Progress and prospects: hurdles to cardiovascular gene therapy clinical trials *Gene Therapy*, v. 18, p. 743-749 DOI: 10.1038/gt.2011.43, 2011
- [8] GUO, X., HUANG, L. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Accounts of chemical research*, v.. 45,P. 971–979, 2012
- [9] (KAPOOR, M.; BURGESS, D.J. ; PATIL, S.D. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *International Journal of Pharmaceutics*, v.427, pp. 35– 57, 2012
- [10] DE LIMA, M.C, SIMOES, S, PIRES, P., FANEC, H., DUZGUNES, N, Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* v.47 ,p. 277–294, 2001
- [11] FELGER, P.L.; GADEK, T.R. ; HOLM,.; ROMAN, R. ; CHAN, H.W. ; WENZ, M. ; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M. ; DANIELSEN, M. Lipofection—a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, v. 84 ,p.7413–7417,
- [12] HASHIDA, M.; YAMASHITA, F.; NISHIDA, K.; NAKAMURA, J. Glycosylated Cationic Liposomes for Cell-Selective Gene Delivery. *Critical reviews in Therapeutic*

Drug Carriers Systems, v. 19, pp. 95-115, 2002. DOI:

10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2

[13] GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, v. 2, p. 710-722, 1995.

[14] KUROSAKI, T. ; MORISHITA, T.; KODAMA, Y.; SATO, K.; NAKAGAWA, H.; HIGUCHI, N.; NAKAMURA, T.;HAMAMOTO, T.; SASAKI, H.; KITAHARA, T. Nanoparticles Electrostatically Coated with Folic Acid for Effective Gene Therapy. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, v.8, pp. 913-919, 2011.

[15] BROWN, MB; JONES, SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *JEADV*, v. 19 , p. 308–318. 2005

[16] KUO, W.J. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2006

[17] HORNOF, M.;DE LA FUENTE, M.;HALLIKAINEN, M.; TAMMI, R.H.; URTTI, A.; Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells, *The Journal of gene medicine*,v. 10, p 70-80; 2008

[18] NAOR, D., NEDVETZKI, S., & GOLAN, I. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v.39, 527–579, 2002.

[19]NAOR, D., SIONOV, R. V., & ISH-SHALOM, D., CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research*, v. 71, p. 241–319, 1997

[20] ELIAZ, R. E. ; NIR, S.; SZOKA, JR. F. C. *Methods Mol. Med. Methods. Enzymol.* v. 387, PP 16–33, 2004

[21] HERRERA, M. B.; BUSSOLATI, B.; BRUNO, S.; MORANDO, L.; MAURIELLO-ROMANAZZI, G.; SANAVIO, F. ; STAMENKOVIC, I. ; BIANCONE, L. ; CAMUSSI, G. *Kidney Int.*, v.72, pp. 430–441, 2007

[22] SURACE, C ; ARPICCO, S ; DUFAY-WOJCICKI, A ; MARSAUD, V ; BOUCLIER, C ; CLAY, D ; CATTEL, L; RENOIR, JM ; FATTAL, E. Lipoplexes Targeting the CD44 Hyaluronic Acid Receptor for Efficient Transfection of Breast Cancer Cells. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, v. 6, pp. 1062-1073, 2009. DOI: 10.1021/mp800215d.

[23] TAETZ, S ; BOCHOT, A; SURACE, C ; ARPICCO, S ; RENOIR, JM ; SCHAEFER, UF ; MARSAUD, V ; Kerdine-Roemer, S ; LEHR, CM ; FATTAL, E . Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells. *OLIGONUCLEOTIDES*, v. 19, pp. 103-115, 2009. DOI: 10.1089/oli.2008.0168

[24] QHATTAL, H.S.S.; LIU, X.; Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol. Pharmaceutics*,v. 8, pp. 1233–1246, 2011

[25] SAGRISTÁ, M.L; MORA, M. and MADARIAGA, M.A; Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules, *Cellular & molecular biology letters* ,v. 5,p 19 –33, 2000.

[26] ESPOSITO, G; CRICH, S.G.; AIME, S. Efficient Cellular Labeling by CD44 Receptor-Mediated Uptake of Cationic Liposomes Functionalized with Hyaluronic Acid and Loaded with MRI Contrast Agents. *ChemMedChem*, v. 3, p. 1858 – 1862, 2008.

- [27] ANTUNES, F.E; MARQUES, E.F; MIGUEL, M.G; LINDMAN, B; Polymer vesicle association , *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148- 2009, pp 18-35
- [28] WANG C, TAM KC. *J Phys Chem B*, v.108, p.8976, 2004.
- [29] ROSADA, R.S., TORRE, L.G.; FRANTZ, F.G. et al. Protection Against Tuberculosis by a Single Intranasal Administration of DNA-hsp65 Vaccine Complexed with Cationic Liposomes *BMC Immunology* v.9, p:38, 2008
- [30] DE LA TORRE, L. G.; ROSADA, R.S.; TROMBONE, A.P.F., FRANTZ, F.G.; COELHO-CASTELO, A.A.M., SILVA, C.L.; SANTANA, M.H.A. Synergy between structural stability and dna-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE vesicles and DOTAP/DOPE lipoplexes. *Colloids and Surfaces*, v.73, p. 175-184, 2009.
- [31] ROSADA RS, SILVA CL, SANTANA MHA, NAKAIE, CR, DE LA TORRE LG. Effectiveness, against tuberculosis, of pseudo-ternary complexes: Peptide-DNA-cationic liposome. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 373, p. 102-109, 2012. doi: 10.1016/j.jcis.2011.09.040
- [32] BALBINO, TIAGO A.; GASPERINI, AAM.; OLIVEIRA, CLP.; AZZONI,AR.; CAVALCANTI,LP.; DE LA TORRE, LG. Correlation of the Physicochemical and Structural Properties of pDNA/Cationic Liposome Complexes with Their *in Vitro* Transfection. *Langmuir*, V.28 (31), p 11535–11545, 2012
- [33] 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.

- [34] PERRIE, Y.; GREGORIADIS, G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1475, p. 125-132, 2000.
- [35] PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. *Vaccine*, v. 19, p. 3301-3310, 2001.
- [36] Pasquali-Ronchetti Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum possible role in the pathogenesis of clinical manifestations, *Journal of*, 2006
- [37] TRIMM, H.H.; JENNINGS, B.R.; Study of hyaluronic acid flexibility by electric birefringence. *Biochem. J.* v. 213, p. 671-677, 1983
- [38] RIGOLETO, T.P.; ZANIQUELLI M.E.D, SANTANA, M.H.A, DE LA TORRE, L.G, Surface miscibility of EPC/DOTAP/DOPE in binary and ternary mixed monolayers, *Colloids and Surface B: Biointerfaces* , v.83, p 260-269, 2011
- [39] IONOV, R.; EL-ABED, A.; GOLDMANN, M. Structural organisation of cationic dioctadecyldimethylammonium bromide monolayers in presence of hyaluronic acid. *Eur Biophys J.*, v. 38, p. 229–235, 2009
- [40] MARSH, D; Lateral pressure in membranes, *Biochim, Biophys. Acta rev. Biomembr.* V. 1286; p 183-223; 1996
- [41] SCOTT, JE, HEATLEY, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *Proc Natl Acad Sci USA* ;v. 96, p. 4850–4855, 1999.
- [42] FENNEL, E.D.F.; Wennerstrom H. *The Colloidal Domain, Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet.* 2<sup>nd</sup> Edition, Wiley-VCH, New York, 1999.
- [43] CHAPMAN D.; URBINA, Studies of lipid-water systems using differential scanning



calorimetry, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 249, No. 8, Issue of April 25 p. 2512-2521, 1974.

---

## CAPÍTULO 4 – ASSOCIATION BETWEEN LOW MOLECULAR WEIGHT HYALURONIC ACID, CATIONIC LIPOSOMES AND PLASMID DNA FOR GENE DELIVERY APPLICATIONS

---

Gabriela S. C. Correa<sup>1</sup>, Tiago A. Balbino<sup>1</sup>, Adriano R. Azzoni<sup>2</sup>,  
Lucimara G. de La Torre<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

<sup>2</sup>Chemical Engineering Department, University of São Paulo, Escola Politécnica, São Paulo, SP, Brazil.

\*Corresponding author: [latorre@feq.unicamp.br](mailto:latorre@feq.unicamp.br)

To be submitted to *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

### 1. Abstract

In this study, we explore the formation of pseudo-ternary complexes based on the electrostatic complexation among plasmid DNA, cationic liposomes (CL) and hyaluronic acid (HA), aiming to improve the transfection for gene delivery applications. HA is an anionic biopolymer and has some advantageous properties, such as the ability to bind to cellular receptors CD44 and RHAMM. We employed the extruded cationic liposomes (ECL) composed of egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), at the proportion of 50/25/25% molar, respectively. We used the plasmid DNA vector model with luciferase as reporter gene at the molar ratio between positive and negative charge (from cationic lipid and phosphate group) of 3, and HA of low molecular weight of 16 kDa. The results showed that the pseudo-ternary complexes are probably formed with the DNA incorporated into the lipid structures followed by DNA/ECL complexes coated by HA, forming the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes. The *in vitro* tests of HeLa cells showed the ability of the DNA/ECL/HA complexes in efficiently transfect

with a nonlinear behavior of the luciferase activity with the amount of HA in the complexes. The DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes at the studied amounts of HA showed to be more efficient in transfect *in vitro* than the DNA/ECL pseudo-binary complexes. These results may be useful for the development of multifunctional nanocarriers for different strategies for gene delivery and vaccine therapy applications.

**Keywords:** HeLa cell, DNA, Hyaluronic acid, Liposome, transfection

## 2. Introduction

Liposome is an amphiphatic system composed of lipids that are self-assembled with an interior aqueous lumen. This colloidal system is recognized as efficient immunoadjuvants, improving the immune response (Shargh et al., 2012; Chauhan et al., 2011). The amphiphilic nature allows applications as drug carriers, and depending on the lipid composition liposomes are biocompatible and have several formulations that have been approved for clinical application (Longo, et al., 2012; Al-Jamal & Kostarelos, 2011). Cationic liposomes (CL) can be considered as promising intracellular delivery systems for nucleic acids and also for other molecules (Gul-Uludag et al., 2012; Ewert et al., 2006). The cationic characteristic of these liposomes enables the transfection of nucleic acid into any cells, since the driving force is the electrostatic difference from the cationic liposome/DNA complex and the anionic cell membrane. This transfection is considered a non-specific target (Chesnoy & Huang, 2000; Thomas & Hassan, 2012; Chan et al., 2012).

One strategy to improve cell specificity in transfection is the use of molecules attached on the surface of the cationic liposomes that can be recognized by receptors from the cell surface. In this context, hyaluronic acid is a mucopolysaccharide found in the extracellular space, synovial fluid, vitreous humour and aqueous humour, and it is a natural bioadhesive, biocompatible polymer (Brown & Jones, 2005, Kuo, 2006). Additionally, this biopolymer can play an important role in cell signaling via CD44 and RHAMM (Hornof et al, 2008, Naor et al., 2002; Naor et al., 1997) and HA receptors (CD44) are expressed in different tumors and stem cells.

To produce stable liposomes containing HA, one alternative is the chemical derivatization of lipids to introduce the HA molecule into the polar headgroup. Different chemical conjugation were already investigated, conjugation of DOPE to HA (Taetz et al., 2009). Another possibility is the electrostatic association of HA and CL. Esposito et al. (2008) investigated the complexation between liposome composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine POPC/DOTAP/cholesterol and HA of high molecular weight (100 – 1000 kDa). These authors explored the capacity of the HA–liposome complex in targeting CD44 receptors with three tumor cell types (C6 rat glioma, B16-F10 mice melanoma, and MCF7 human breast cancer), demonstrating that simple electrostatic interactions between liposome and HA can be effective. By exploring different HA molecular weights, Qhattal & Liu (2011) chemically conjugated HA on the surface of liposomes and observed that the cellular targeting efficiency has a strongly dependence of the HA molecular weight, and the HA/liposomes complexes were taken up via endocytosis, which corroborates the potential use of the HA/liposome nanostructures in targeted drug delivery applications.

In this context, the electrostatic interaction between CL and HA emerges as a promising strategy for specific targeting for gene and intracellular delivery. This process is simpler than the first presented, where chemical derivatization is involved.

Our research group has been investigating the use of cationic liposomes composed of egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) as dehydrated-hydrated vesicles to nasally delivery DNA<sub>hsp65</sub> as a single dose tuberculosis vaccine via intranasal administration (Rosada et al 2008, de la Torre et al. 2009). These liposomes were functionalized by adding the nuclear localization signal to facilitate the plasmid delivery into the cell nucleus (Rosada 2012) and also obtained as extruded cationic liposome and *in vitro* transfection was evaluated (Balbino et al., 2012).

The EPC/DOTAP/DOPE liposomes can also be functionalized by conjugating it with HA for specific cellular target. In our previous work (Correa et

al., to be submitted), we investigated HA/CL (EPC/DOTAP/DOPE) complexes and the influence of HA molecular weight and size on the liposome electrostatic interaction. HA molecular weight of 16 kDa and extruded cationic liposomes (ECL) were obtained with size at approximately 200 - 400 nm, depending on the amount of HA. In this context, our goal in this study was to obtain the pseudo-ternary complex (DNA/ECL/HA). The particles were physicochemically characterized and the ability to transfect Hela cells *in vitro* was evaluated.

### **3. Materials and methods**

#### **a. Materials**

Sodium Hyaluronate (HA) of different molecular weights 6 and 16 kDa were purchased from Lifecore. The lipids, egg phosphatidylcholine (EPC) (96% of purity), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (99.8% of purity) and the 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) (98% of purity) were purchased from Lipoid and used without further purification. Water was purified by Milli-Q-plus™, deionized until resistivity of 18.2 MΩ cm and filtered (0.22 μm). All chemicals were used of analytical grade.

### **4. Methods**

#### **a. Plasmid DNA amplification**

We used pVAX-LUC as plasmid DNA vector model with luciferase as reporter gene. The pDNA was amplified in *Escherichia coli* bacteria and purified using PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep K2100-07 (Invitrogen). The pDNA quality and quantity were spectrophotometrically measured with an ND-1000 NanoDrop UV-Vis spectrophotometer (PeqLab, Erlangen, Germany).

#### **b. Cationic liposome preparation**

The cationic liposomes were prepared according to Bangham's method (Bangham et al 1965). Briefly, the required amounts of all lipid stock solutions in chloroform (EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar) were mixed and dried to a thin film using a rotary evaporator in a 650 mmHg vacuum for 1 hour. The dried lipid

film was hydrated at 16 mM with water at 30°C above its phase transition temperature (Rosada et al. 2008 and de la Torre et al. 2009, Balbino et al., 2012). The liposomes were extruded through two stacked polycarbonate membranes (100 nm nominal pore) 15 times under nitrogen pressure of 12 kgf/cm<sup>2</sup>. The liposomes were named as extruded cationic liposomes (ECL).

***c. Electrostatic complexation between DNA, extruded cationic liposome and hyaluronic acid (DNA/ECL/HA)***

The formation of the pseudo ternary DNA/ECL/HA complex was carried out after obtaining the ECL/DNA pseudo-binary complex. Basically, DNA in water was added in the cationic liposome dispersion under vortex and in ice bath according procedure described by Balbino et al., 2012. We controlled the proportion between liposomes and DNA using the concept of molar charge rate ( $R_{+/-}$ ), that relates the ratio between the cationic molar charges from the lipid DOTAP (monocationic) and the anionic molar charges from DNA (1  $\mu$ g do DNA represents 3 nmoles of negative charges). We complexed DNA and ECLs at  $R_{+/-} = 3$ .

DNA/ECL/HA complexes were obtained by adding sodium hyaluronate solution 0.3% m/v (mass HA/volume water) into DNA/ECL pseudo-binary complexes in three steps under vortex and using ice bath. The HA mass percentage was determined based on the total lipid + HA mass according Correa (*to be submitted*).

***d. Physicochemical characterization***

***i. Average hydrodynamic diameter and polydispersity***

The average hydrodynamic diameter and size distribution were measured by means of the dynamic light scattering (DLS) technique, using Malvern, Zetasizer Nano ZS, with a backscattering configuration with detection at a scattering angle of 173° with a He/Ne laser emitting at 633 nm and a 4.0 mW power source. The mean diameter and distribution of particle sizes were estimated by CONTIN algorithm analysis. We used the number-weighted average diameter given by the software of the equipment. The size distribution was evaluated with the

polydispersity index, which has a range from 0 up to 1, indicating more and less homogeneous distribution of the particle size, respectively. All the analyzed samples were diluted at a lipid concentration of ~0.2 mM before analysis. The zeta potential was measured in water, at the temperature of 25°C by using Zetasizer Nano ZS. The measurements were performed in triplicate for each sample at 25 °C, in water. The viscosity was assumed to be the same as that of water.

### ***ii. Morphology***

The morphology of DNA/ECL/HA complexes was observed using Transmission Electron Microscopy (TEM) and the negative staining technique. Carbon-coated 200 mesh copper grids with collodion (parloidin with solution of ammonium molybdate 2%) film were used. Each liposome preparation was diluted to 1 mM total lipid and then applied to the carbon grid. After incubation for 5 minutes at room temperature, the excess was blotted. We used the electronic microscopic model LEO 906 E, together the camera MEGA VIEW III /Olympus and the software ITEM E 23082007/ Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

### ***iii. Gel retardation assay***

We used agarose gel electrophoresis technique to verify whether the ECL and ECL/HA complexes were able to incorporate the DNA into their structures. The DNA/ECL complexes at molar charge ratio of 3 (containing 1 µg of pDNA) were electrophoresed in 1,5% agarose gel plus 5 µg/mL ethidium bromide solution in buffer solution TBE 1X(Tris-borate-EDTA) at 80V during 40 minutes. The location of the DNA was then visualized and photographed using an ultraviolet image acquisition system.

### ***iv. Plasmid DNA accessibility***

The DNA accessibility to the fluorescence probe (Pico Green) was determined at different molar HA amounts. All dilutions were made in polypropylene tubes to avoid PicoGreen absorption into container surfaces.

*Fluorescence measurement:* The working solution was prepared by diluting the Pico Green stock solution 200 times in TE buffer (10mM Tris/HCl/1mM EDTA, pH 7.5). One hundred microliters of the working solution was added to 100

microliters of the complexed mixture (DNA/ECL/HA in different HA amounts) and incubated for 5 min. The intensity of the fluorescence was then measured on a fluorimeter plate (Novostar, BMG Labtech) using excitation and emission wavelengths of 485 and 525 nm, respectively, according to the manufacturer's specifications. The fluorescence intensity profiles (absolute values) were expressed and plotted as a function of the HA amount in the complexes.

#### ***e. Culture and transfection of HeLa cells***

The biological evaluation of the complexes was assessed by the *in vitro* transfection in human epitheloid carcinoma (HeLa) cells. Cells were cultivated in F-12 (Ham) nutrient mixture (Gibco, UK), containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Gibco, UK) and supplemented with non-essential amino acids (Gibco, UK), gentamicin (Gibco, UK), sodium pyruvate (Gibco, UK), and antibiotic–antimycotic (Gibco, UK). Cultures were incubated under 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h in a humid atmosphere and allowed to grow near confluency and harvested with trypsin. After reaching confluence, cells were seeded into 24-well culture plates ( $5 \times 10^4$  cells per well). The cells were then incubated for 48 h and transfected with 0.8 µg of pVAX-Luc per well and the medium was replaced 6 h after the transfection to remove plasmids not internalized by cells. The medium was removed, the cells were washed using PBS, lysed, and the luciferase activity was determined according to the Promega Luciferase Assay protocol. The Relative Light Units (RLUs) were measured with chemiluminometer (Lumat LB9507, EG&G Berthold, Germany). The total protein was measured according to a BCA protein assay kit (Pierce) and luciferase activity was expressed as RLU/mg protein.

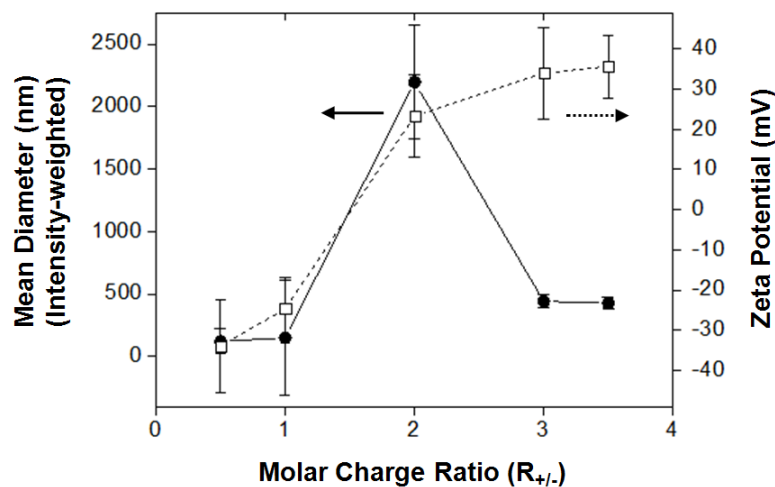
### ***5. Results***

#### ***a. DNA/ECL pseudo-binary complex***

We produced ECLs with average diameter and zeta potential of approx.  $121.2 \pm 25.6$  nm and  $+44.4 \pm 3.5$  mV, respectively (TAB 1). The pseudo binary complex DNA/ECL was obtained by adding the amount of DNA into the ECL dispersion. We studied the average diameter and zeta potential to identify the best



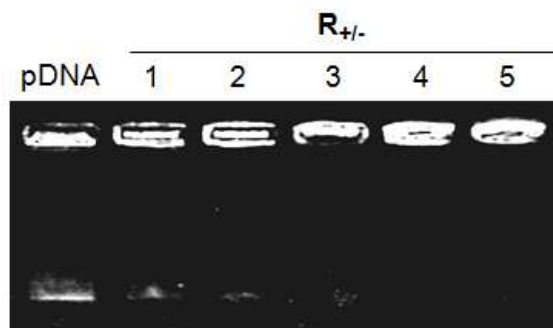
molar charge ratio  $R_{+/-}$  (positive charge from cationic lipid/negative charge from DNA) that produces complexes with positive zeta potential and average diameter close to the “empty” cationic liposomes, and also capable to incorporate DNA into the liposomal structure. Beside this complexation was previously investigated in our research group using PBS as buffer (Balbino et al., 2012), we investigated the same complexation, but in this case, the complexation was carried out in water (low ionic strength). FIG 1 presents the average diameter and zeta potential of DNA/ECL complexes at different  $R_{+/-}$ . We can observe that values of  $R_{+/-}$  higher than 3 the average diameter and zeta potential are close to ECL. The zeta potential profile had a sigmoidal shape, where the inversion point of the zeta potential values from negative to positive net charge is around  $R_{+/-}$  2. The particle size behavior had a Gaussian format with the largest particle of average diameter of approx. 2,000 nm (at  $R_{+/-}$  2,0). Our results are in good agreement with reported results for other liposomal configurations (Balbino et al., 2012; Munoz-Ubeda et al., 2011; Amenitsch et al, 2011).



**FIG 1: Average zeta potential and diameter profiles of the DNA/extruded cationic liposome complexes as function of molar charge ratio,  $R_{+/-}$ . The error bars represent the standard error of independent triplicates.**

We used agarose gel electrophoresis technique (gel retardation assay) to identify the  $R_{+/-}$  in which all DNA was completely incorporated into the liposomal structure. According to FIG 2, it is demonstrated that values of  $R_{+/-}$  higher than 2 all

DNA is incorporated into the ECL, since there is no observed lane for free DNA. Considering the size and zeta potential profiles (FIG 1) and the gel retardation assay (FIG 2), we selected  $R_{+/-} = 3$  for further studies with HA complexation, since all the DNA is incorporated into the liposomal structure and the size and zeta potential are close to “empty” ECL.



**FIG 2: Agarose gel electrophoresis (0.8%) of pseudo-binary cationic liposome/DNA complexes different molar charge ratios ( $R_{+/-}$ ).**

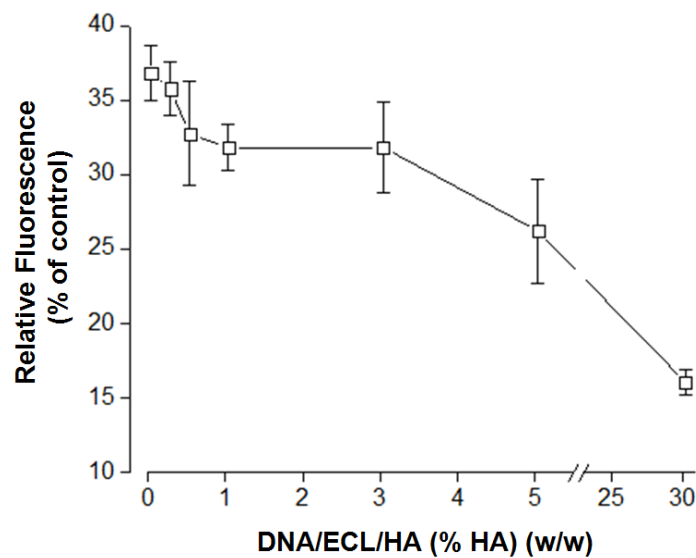
***b. Pseudo Ternary Complex ECL/DNA/HA***

To evaluate whether the DNA remain electrostatic incorporated into the cationic liposomes after the complexation with HA, gel retardation assay was carried out and it is shown in FIG 3. We investigated the effect of adding different HA amounts. It is possible to verify that all DNA is completely retained in the liposomal structure, since only the free plasmid DNA migrated out of the well, giving rise to two characteristics bands.



**FIG 3: Agarose gel electrophoresis (1.5%) of pseudo-ternary HA/ cationic liposome/DNA complex at different molar HA amounts Lanes: 1)CL-DNA 2) HA/CL-DNA 0.25%;3) HA/CL-DNA 0.5%;4) HA/CL-DNA 1%;5) HA/CL-DNA 3%;6) HA/CL-DNA 5%;7) HA/CL-DNA 30%. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was  $R_{+/-} = 3$**

The DNA accessibility to fluorescent probe was quantified using PicoGreen reagent to test the intensity of the internalization of the DNA in the pseudo-ternary complexes (FIG 4). The fluorescence is proportional to the quantity of the double-strand DNA that is not electrostatic bound. FIG 1 shows that there is a decay when the amount of HA is increased in the complexes, suggesting that the DNA is internalized in the complexes (less accessible) by the HA presence. Additionally, the biopolymer used has a low molecular weight (16 kDa) and we did not observe high viscosity of the solution, which would probably provide an additional resistance to the probe accessibility.



**FIG 4: Fluorescence profile as function of the amount of hyaluronic acid in the pseudo-ternary DNA/ECL/HA complexes using the PicoGreen probe. Results with free DNA used as control in ultra pure water. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was  $R_{+/-} = 3$ . Error bars correspond to standard deviation of three independent experiments.**

We explored the formation of the electrostatic binary complex ECL/HA and ternary complex DNA/ECL/HA at  $R_{+/-}$  of 3, to verify the influence of the biopolymer on the mean hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity of the particles, as summarized in TAB 1.

**TAB 1: Physicochemical properties of extruded cationic liposomes (ECL), ECL/DNA binary complexes and DNA/ECL/HA pseudo ternary complexes**

Aggregate		Mean Diameter (nm) <sup>b</sup>	Zeta Potencial (mV)	Polydispersity
ECL		121±26	+44±4	0.20 ± 0.06
ECL/DNA		122 ± 25	+43 ± 5	0.23 ± 0.04
ECL/HA <sup>c</sup>				
	0.25	133 ± 12	+ 42 ± 2	0.22 ± 0.06
	0.5	156 ± 25	+ 42± 2	0.35 ± 0.05
% HA	1	369 ± 34	+ 42 ± 2	0.32 ± 0.02
	3	437 ± 99	+ 39 ± 2	0.28 ± 0.07
	5	431 ± 102	- 41 ± 3	0.31 ± 0.03
	30	341 ± 112	- 42 ± 2	0.80 ± 0.09
	DNA/ECL/HA			
	0.25	479 ± 13	+ 48.0 ± 0.2	0.20 ± 0.05
	0.5	328 ± 35	+ 45 ± 5	0.40 ± 0.01
% HA	1	263 ± 5	+ 31 ± 1	0.30 ± 0.05
	3	352± 11	+ 29.5 ± 0.3	0.40 ± 0.04
	5	361 ± 31	- 29.4 ± 0.2	0.62 ± 0.06
	30	323 ± 44	- 43.8 ± 0.3	0.70 ± 0.01

Notes: <sup>a</sup>HA 16 kDa: average diameter and zeta potential of 393.5 ± 56.9 nm and - 37.6 ± 4.2, respectively, measured only as control;

<sup>b</sup>Results were calculated in triplicate and expressed by the intensity of scattered light and converted to number-weighted mean diameter and size distribution

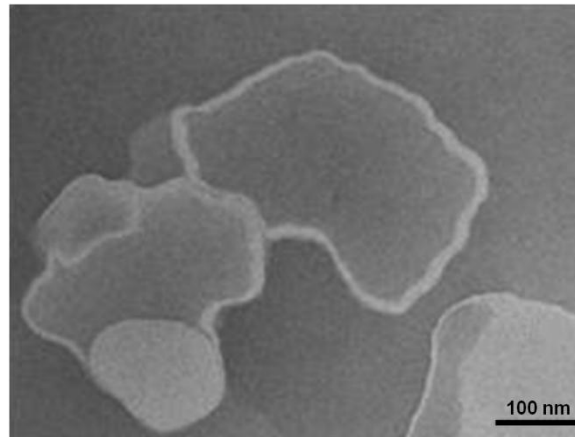
<sup>c</sup>Positive lipid molar charge/negative DNA molar charge rate,  $R_{+/-} = 3$ .

According to TAB 1, it is possible to observe an increase in the hydrodynamic diameter and in the polydispersity of the particles when the ECL is complexed with DNA.

The increase of the amount of HA in the ECL increases the mean diameter and polydispersity of the ECL/HA complexes and gradually decreases the zeta potential until reach negative values. Such event also occurs when the HA is complexed to the DNA/ECL pseudo-binary complexes, forming the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes. For higher amount of HA (5 and 30%), the zeta potential is negative, indicating the predominance of HA in the surface of the

particles. However the polydispersity is increased to 0.8 at 30% HA. The higher the HA concentration, the higher the polydispersity is.

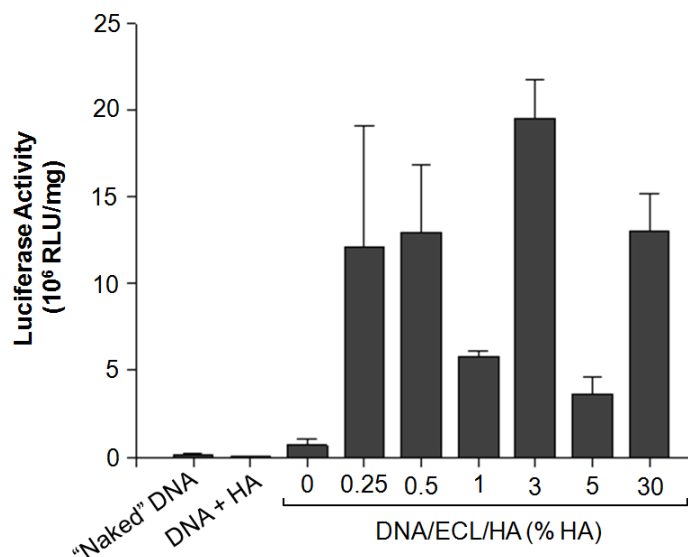
The morphology of the pseudo-ternary complexes was evaluated by means of transmission electron microscopy (TEM) using the negative staining technique (FIG 5).



**FIG 5: Transmission electron micrograph of DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes at molar charge ratio of 3 and amount of HA (molecular weight 16 kDa) of 0.25 % (w/w). Scale bars represent 100 nm.**

### ***c. In Vitro Transfection of HeLa Cells***

With the characterized complexes, we selected eight configurations to assess the ability in transfect *in vitro* HeLa cells. As shown in FIG 6, the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes demonstrated superiority in transfect than DNA/ECL pseudo-binary complexes. We can observe that there is very low transfection level, expressed for the luciferase activity, when using “naked” DNA or DNA with HA. The gradual increasing in the HA amount in the complexes did not have a linear trend in transfection. However, we noticed an overall increase in transfection level regardless of the HA concentration, with a maximum of 5.4-fold higher for 5% of HA.



**FIG 6: In vitro efficacy of HeLa cell transfection using “naked” plasmid DNA, DNA + HA 16kDa, DNA/ECL and DNA/ECL/HA complexes at different percentages of HA at molar charge ratio of 3. Luciferase activity was expressed in RLU/mg of protein. The molar charge ratio between the ECL and DNA used was R $\pm$  3. The error bars represent the standard error of triplicates. \* p < 0.05 was considered statistically.**

## 6. Discussion

This research has the goal to evaluate whether the pseudo-ternary complex extruded cationic liposomes (EPC/DOPE/DOTAP), hyaluronic acid and plasmid DNA can be employed in gene delivery systems. This investigation was based on previously study that reported an increase in cellular uptake of EMA-DNA and GFP expression on RAA SMC cell line (smooth muscle cells from rabbit aortic media) when HA was simply mixtured (3-fold the anionic charge excess) before transfection, suggesting at that moment that intracellular factors are involved in the DNA delivery (Ruponen et al., 1999).

In our previously study, we investigated the electrostatic complexation between ECL and HA. We observed that HA of low molecular weights (6 and 16 kDa) produces significant physico-chemical changes in the final nanoparticle. HA 16 kDa presents lower rigidity (stiffness) allowing better liposome coating, generating final complexes in nanoscale range, even at high HA concentration.

Additionally, the use of ECL allows the formation of final complexes ranging from 200–400nm (Correa et al., *to be submitted*). The HA presence also disturbs the bilayer, based on the Langmuir monolayer study and differential scanning calorimetry.

Based on this previous study of Correa (*to be submitted*), we selected ECLs and HA 16 kDa (in different concentrations) for DNA incorporation. We used the pVAX-Luc as plasmid DNA model, since it encodes a luciferase reporter gene, enabling easy assessment of transfection efficiency. We carried out all the complexation studies hypothesizing the salt present in buffers could interfere in the final complexes, since HA is a weak acid.

The first investigation was the complexation between ECL and DNA. We investigated the condition of molar charge ratio ( $R_{+/-}$ ) that all DNA is carried by the CL. The  $R_{+/-}$  value is obtained by relating the number of positive moles of the cationic lipid (DOTAP) and the number of negative moles from the phosphate group of the plasmid DNA (3 nmol/ $\mu$ g). Our previous experience carried out this complexation in PBS as aqueous media and we could observe that at  $R_{+/-}$  3 the final complex presented similar properties to the “empty” ECL, and at  $R_{+/-}$  1.5 all DNA was incorporated into the lipid structure (Balbino et al., 2012). When we complexed DNA and ECL in water, we observed similar gel retardation assay, size and zeta potential results (FIG 1 ,FIG 2, and TAB 1) when complexed in PBS, suggesting that there is no significant differences in water or PBS. We considered the  $R_{+/-}$  = 3 to continue the studies with HA complexation, the same previously selected for complexations in PBS (Balbino et al. 2012). It is interesting to note that at this condition, the zeta potential is 43.2 mV, enabling the electrostatic complexation with HA and with all DNA incorporated into the structure.

We carried out the gel retardation assay to confirm that there is no free DNA after HA complexation (FIG 3). HA and DNA could compete for the cationic charges from the liposome. We did not observe free DNA after incorporating HA and this result is in accordance with observations of Ruponen et al. (2001), that HA is a weak acid and it cannot release DNA from liposomes. The accessibility also confirms DNA incorporation into the pseudo-ternary complex even at high HA

content (30%) (FIG 4). In this case, since we did not observe differences in viscosity (HA 16kDa is not a viscous solution, similar to water) and probably there is no fluorescent probe diffusion resistance, the decrease in fluorescence with increase in HA concentration is probably due to the HA aggregation on the liposome surface. We observed this phenomena, based on the HA tertiary structure. The HA molecules are organized on the liposome surface and allow the orientation of the secondary structure in solution, since it is related to the hydrophobic faces formed by the axial hydrogen atoms and CH groups. This secondary structure allows the formation of a tertiary structure as a result of molecular aggregation (Scott & Heatley, 1999, Brown & Jones, 2005). The electrostatic interaction between the liposome and the first HA molecules can probably guide hydrophobic interactions among other HA molecules, leading to a decrease in the fluorescence probe.

The HA electrostatic association with the pseudo-binary complex DNA/ECL was carried out at different conditions, basically increasing the amount of HA. According to TAB 1, the hydrodynamic diameter of DNA/ECL/HA increases with the increase in HA concentration. We observed this effect even for small amounts of HA (0.25 and 0.5%). However, the zeta potential did not changed linearly with the increase in HA concentration, but at HA 5% we observed shift in module (became negative). This behavior suggests that, when the HA is added to the DNA/ECL complexes, the biopolymer is probably located on the more external part of the pseudo-ternary complexes. This behavior was observed with or without DNA. For higher amounts of HA, the DNA/ECL/HA complexes have similar diameter. The possible explanation is that, in the presence of DNA, the ELC has less positive charge available for the electrostatic interaction with the biopolymer chains, which would increase the interaction among the biopolymer, forming layers coating the liposome surface and with larger complexes size. The DNA/ECL/HA micrograph suggests this type of aggregation (FIG 5) and the presence of DNA presents similar morphology as previous reported for ELC/HA complexes (Correa, to be submitted). For small amounts of HA, all the biopolymer is in contact with the liposome, while for higher amounts, the HA covers the liposome in multiple layers

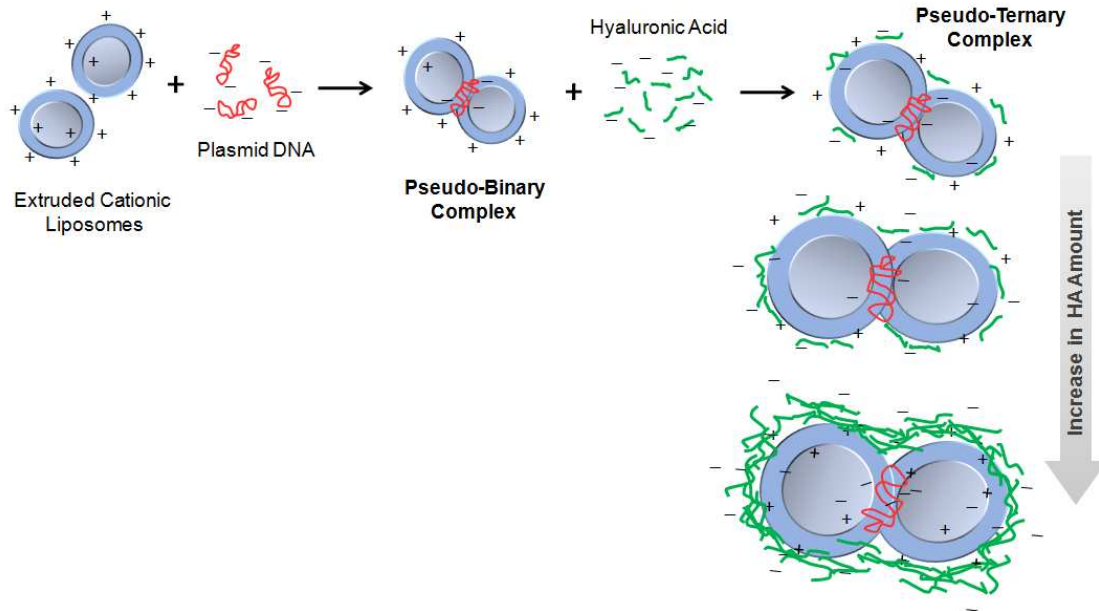


and long range interactions can affect the aggregation. Furthermore, according to Balbino et al. (2012), at  $R_{+/-}$  of 3, using the same lipid composition, the plasmid DNA is sandwiched by two vesicles and there is no fusion of vesicles that can increase the number of bilayers of the pseudo-binary complex. Based on this described hypothesis, we proposed a representative mechanism that illustrates the formation of the pseudo-ternary complex, as summarized in FIG 7.

The TEM image (Figure 5) show that the particles are interacting, with the presence of HA. Based on our previous study (Correa et al., *to be submitted*), the HA is located more on the liposome surface, covering the lipid bilayer. Furthermore, the HA chains interact among each other, suggesting the formation of the HA ternary structure, which does not occur when lower amounts of HA is used, where the cationic liposomes structure predominate under the zeta potential analysis.

The following step in this research was to check the integrity of DNA and whether it remains in the liposomal structure after the formation of the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes. According to the gel retardation assay (FIG 3), it is possible to confirm that the HA does not interfere in the DNA incorporation. Our results are in accordance with Ruponen et al., (2001) who verified that HA has a weaker electrostatic interaction with the CL than the DNA.

To better characterize the influence of the HA on the pseudo-ternary complexes, we quantified the DNA accessibility to fluorescent probe (FIG 4). We can observe a decrease in DNA accessibility due to the decrease in the fluorescence, as the HA amount in the complexes is increased. This also suggests that the biopolymer protects the DNA/ECL pseudo-binary complexes.



**FIG 7. Schematic representation of the hypothesized mechanism of formation of the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes. The amount of DNA can completely cover the cationic liposome surface and the negative zeta potential sign takes place.**

On the basis of the physicochemical study, we selected different compositions of the DNA/ECL/HA pseudo-ternary complexes to assess the *in vitro* transfection of HeLa cells (FIG 7). “Naked” DNA and DNA with HA were used as control and the amount of HA in the complexes varied from 0 to 30%. Figure 6 shows an increase in the transfection level when using the HA to form the pseudo-ternary complexes for all percentages, however the statistical analysis revealed that such difference is not significant. Besides the amount of HA in the complexes, another important factor that may influence on the transfection study is the high polydispersity of the complexes and how this parameter varies among the studied complexes, since there is different particle sizes interacting in a different manner to the cell membrane. Furthermore, once the HeLa cells present both HA receptors, CD44 and RAMM, the transfection phenomenon is specific, while for the DNA/ECL complexes the interaction is nonspecific. Thus, when the HA receptors are completely interacting with the particles, an excess of HA would not affect on the interactions.

## 7. Conclusion

The results reported herein indicate the potentiality of the pseudo-ternary complexes formed by plasmid DNA, extruded cationic liposomes and hyaluronic acid on gene delivery applications. Such system has evident advantage under the DNA/ECL pseudo-binary complexes, since it also can be employed for nasal vaccination due to the mucoadhesive properties of the HA biopolymer. Additionally, these findings may be useful for the rational development of multifunctional nonviral carriers.

## 8. References

- AL-JAMAL, W.; KOSTARELOS, K. Liposomes: From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine. **Accounts of Chemical Research**. V. 44, p. 1094–1104, 2011.
- BALBINO, TA; GASPERINI, AAM; OLIVEIRA, CLP; AZZONI, AR; CAVALCANTI, LP; **DE LA TORRE, LG**. Correlation of the Physicochemical and Structural Properties of pDNA/Cationic Liposome Complexes with Their in Vitro Transfection. *Langmuir*, v.28, p. 11535–11545, 2012. DOI: 10.1021/la302608g
- BROWN, MB; JONES, SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **JEADV** v. 19 , p. 308–318, 2005
- C. LAYE, C.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. **Journal of Food Science**. v. 73, p. N7-15, 2008.
- CHAN, C.; MAJZOUB, R. N. ; SHIRAZI, R. S.; EWERT, K. K.; CHEN, Y.; LIANG, K. S.; SAFINYA, R. S. Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposomeeDNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid. **Biomaterials**. v. 33, p. 4928 – 4935, 2012.
- CHAUHAN, A.; SWALEHA, Z.; AHMADC, N.; FARAZUDDINA, M.; VASCOD, A.; ABIDAE, M.; MOHAMMAD, O. Escheriosome mediated cytosolic delivery of *Candida albicans* cytosolic proteins induces enhanced cytotoxic T lymphocyte response and protective immunity. **Vaccine**. v. 29, p. 5424–5433, 2011.

- 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.
- DE LA TORRE, L. G.; ROSADA, R.S.; TROMBONE, A.P.F., FRANTZ, F.G.; COELHO-CASTELO, A.A.M., SILVA, C.L.; SANTANA, M.H.A. Synergy between structural stability and dna-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE vesicles and DOTAP/DOPE lipoplexes. *Colloids and Surfaces*, v.73, p. 175-184, 2009.
- EASTMAN,S.J.,SIEGEL, C., TOUSIGANT,J., SMITH, A.E. ,CHENG S.H., SCHEULE R.K. , Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes, **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1325, p. 41–62, 1997
- ESPOSITO, G.; CRICH, S. G.; AIME, S. Efficient Cellular Labeling by CD44 Receptor-Mediated Uptake of Cationic Liposomes Functionalized with Hyaluronic Acid and Loaded with MRI Contrast Agents. **Chem. Med. Chem.** v. 3, p. 1858 – 1862, 2008.
- EWERT, K. K.; EVANS, H. M.; ZIDOVSKA, A.; BOUXSEIN, N. F.; AHMAD, A.; SAFINYA, C. R. A Columnar Phase of Dendritic Lipid-Based Cationic Liposome-DNA Complexes for Gene Delivery: Hexagonally Ordered Cylindrical Micelles Embedded in a DNA Honeycomb Lattice. **J. Am. Chem. Soc.** v. 128, p.3998-4006, 2006.
- FERRARI M.E., NGUYEN C.M.,ZELPHATI O., TSAI Y. ,FELGER P.L. , Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes, **Human GeneTherapy** v. 9 p, 341–351, 1998.
- 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.
- GUL-ULUDAG, H.; XU, P.; MARQUEZ-CURTIS, L. A.; XING, J.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; CHEN, J. Cationic Liposome-Mediated CXCR4 Gene

- Delivery into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: Implications for Clinical Transplantation and Gene Therapy. **Stem Cells and Development**, v. 21, p. 1587-1596, 2012.
- HORNOF, M.; DE LA FUENTE, M.; HALLIKAINEN, M.; TAMMI, R.H.; URTTI, A.;  
Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells, *The Journal of gene medicine*, v. 10, p 70-80; 2008
- KUO, J.W., *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
- LI, P.; LIU, D.; SUN, X.; LIU, C.; LIU, Y.; ZHANG, N. A novel cationic liposome formulation for efficient gene delivery via a pulmonary route. **Nanotechnology**, v. 22, p. 245104, 2011.
- LONGO, J. P. F.; LEAL, S. C.; SIMIONI, A. R.; ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. **Lasers Med Sci**, v. 27, p. 575–584, 2012.
- M. B. HERRERA, B. BUSSOLATI, S. BRUNO, L. MORANDO, G. MAURIELLO-ROMANAZZI, F. SANAVIO, I. STAMENKOVIC, L. BIANCONE, G. CAMUSSI, **Kidney Int.**, v. 72, p. 430–441, 2007
- NAOR, D., NEDVETZKI, S., & GOLAN, I. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v.39, 527–579, 2002.
- NAOR, D., SIONOV, R. V., & ISH-SHALOM, D., CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research*, v. 71, p. 241–319, 1997
- QHATTAL, H. S. S.; LIU, X. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. **Mol. Pharmaceutics**, v. 8, p. 1233–1246, 2011.

- R. E. ELIAZ, S. NIR, F. C. SZOKA, JR., Interactions of hyaluronan-targeted liposomes with cultured cells: modeling of binding and endocytosis. **Methods. Enzymol**, v. 387, p. 16–33, 2004.
- ROSADA, R.S., TORRE, L.G.; FRANTZ, F.G. et al. Protection Against Tuberculosis by a Single Intranasal Administration of DNA-hsp65 Vaccine Complexed with Cationic Liposomes *BMC Immunology* v.9, p:38, 2008
- [Ruponen, M.](#); [Rönkkö, S.](#); [Honkakoski, P.](#); [Pelkonen, J.](#); [Tammi, M.](#); [Urtti, A.](#) Extracellular Glycosaminoglycans Modify Cellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276 (36), p. 33875–33880, 2001.
- RUPONEN, M.; YLÄ-HERTTUALA, S.; URTTI, A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1415, p. 331-341, 1999.
- SCOTT, JE, HEATLEY, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. **Proc Natl Acad Sci USA**; v. **96**, p. 4850–4855, 1999.
- SHARGH, V. H.; JAAFARI, M. R.; KHAMESIPOUR, A.; JALALI, S. A.; FIROUZMAND, H.; ABBASI, A.; BADIEE, A. Cationic liposomes containing soluble *Leishmania* antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. **Parasitol Res.** v. 111, p. 105–114, 2012.
- TAETZ, S.; BOCHOT, A.; SURACE, C.; ARPICCO, S.; RENOIR, J.; SCHAEFER, U.F.; MARSAUD, V.; Kerdine-Roemer, S.; LEHR, C.; FATTAL, F. Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells. **Oligonucleotides**. 19:103-16, 2009
- THOMAS, A.; HASSAN, R. Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma. **Lancet Oncol.** v. 13, p. 301–10, 2012.

---

## **CAPÍTULO 5 – PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS PSEUDO- TERNÁRIOS (DNA/LIPOSSOMAS CATIÔNICOS /ÁCIDO HIALURÂNICO) CONTENDO LACK DNA PARA ESTUDOS *IN VIVO* NO COMBATE DA LEISHMANIOSE**

---

### **1. RESUMO**

### **2. Introdução**

As doenças negligenciadas são doenças que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas, a exemplo da leishmaniose, da tuberculose, da doença do sono, da malária, e da doença de Chagas, que geram um impacto devastador sobre a humanidade (DNDi/*Drugs for Neglected Diseases initiative*, 2008).

Estima-se que, entre 1985 e 2003, ocorreram 523.975 casos de Leishmaniose, sendo na sua maioria nas regiões norte e nordeste do Brasil. Esta doença é causada por um protozoário parasita pertencente ao gênero *Leishmania* e possui vários tipos de manifestações clínicas, desde úlceras cutâneas até infecções fatais, o que permite classificar o tipo de infecção (cutânea ou visceral).

A principal terapia baseia-se na aplicação de sais de antimônio injetáveis como o Glucantime e Pentostan. O problema se agrava com o aparecimento de resistência a esses fármacos, criando regiões com a manifestação endêmica dessa doença (Lira et al., 1999).

Em termos de prevenção, o desenvolvimento de vacinas é um importante fator para a minimização de ocorrências desta doença.

A vacina comercial Leishvacin® é uma vacina intramuscular ou subcutânea contendo lisado de promastigota de *L. amazonensis* que foi desenvolvida no Brasil pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink. Apesar de estudos clínicos de Fase I terem atestado sua segurança (Marzochi *et al.*, 1998) e de fase II atestarem sua

imunogenicidade (de Luca *et al.*, 1999), estudos de fase III não confirmaram sua eficácia em humanos (Vélez *et al.*, 2005).

A Leish-Tec® é outra importante vacina comercial de uso veterinário que foi desenvolvida e disponibilizada para a comercialização desde o início de 2009, formulada utilizando como base a proteína recombinante A2 de *L. donovani*. Esta vacina vem demonstrado indução de respostas protetoras em cães e camundongos vacinados (Fernandes *et al.*, 2008).

Um grande número de vacinas genéticas tem sido empregado em modelos experimentais induzindo proteção contra as diferentes formas de leishmaniose. Como todas as espécies de Leishmanias são geneticamente semelhantes, desta forma a produção de uma vacina gênica única é viável para tratamento e prevenção (Rodrigues Junior *et al.*, 2004).

No caso de estudos de vacinas de DNA para a prevenção da Leishmaniose, destaca-se o plasmídeo LACK DNA que codifica proteína LACK (homóloga de Leishmania de receptores de proteína quinase C ativada) de 36 kDa, sendo altamente conservada entre as diferentes espécies e formas evolutivas de Leishmania, conforme reportado por Gomes *et al.* (2007). Estes autores mostraram a potencialidade desta vacina quando aplicada pela rota intranasal.

No entanto quando o DNA é administrado livremente, devido a sua instabilidade química frente aos vários componentes corpóreos, reduz a eficácia da vacina. Desta forma a administração de DNA nu como vacinas não são ideais.

Desta forma, os efeitos de veiculadores têm sido investigados com o objetivo 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.

Os lipossomas catiônicos apresentam-se promissores, pois permitem a proteção do DNA e o acoplamento na sua 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 (Labas et al., 2010, De Rosa & La Rotonda, 2009 e Lasic, 1993).

Apesar dos resultados promissores de aplicações intranasal das vacinas lipossomais contendo DNA, é interessante que o projeto de sistemas nanoparticulados seja continuado, focando agora a elevação da eficiência da entrega do DNA por esta rota

A rota intranasal é considerada promissora devido à constituição da mucosa nasal (Davis, 2001 e Partidos, 2000), pois a região nasal é rica em tecido linfóide e é altamente vascularizada (Almeida et al., 1996). Esta característica permite a indução da imunidade da mucosa e sistêmica a partir da vacinação pela rota nasal de animais e humanos (Ugwoke et al. 2005). A administração nasal é barata, simples, permite a eliminação de agulhas, diminuindo o risco de doenças infecciosas (Zouh et al., 2010).

Existem várias moléculas consideradas como agentes mucoadesivos, tais como o ácido hialurônico, a quitosana, o carbopol, dentre outros (Andrews et al., 2009, Kharenko et al., 2009). O ácido hialurônico é um polissacarídeo presente naturalmente nos tecidos conjuntivos de animais e tem apresentando importantes aplicações na área médica, no tratamento de doenças degenerativas, inflamatórias, dentre outros (Ludwig, 2005, Liao et al., 2005, Illum et al., 1994). Devido a sua característica de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não imunogenicidade e propriedades mucoadesivas, pode também ser utilizado em sistemas micro e nanoparticulados para carreamento e liberação sustentada de biofármacos (Prestwich & Vercruyse, 1998, Pritchard et al., 1996).

A associação de ácido hialurônico com lipossomas catiônicos constitui uma estratégia promissora para a entrega de vacinas de DNA.

Uma análise comparativa recente entre estas associações de polímeros com micelas (surfactantes) e vesículas foi realizada por Antunes et al (2009), onde verifica-se que as interações polímero e surfactantes ou polímeros e vesículas lipídicas tem essencialmente as mesmas forças envolvidas como ligação eletrostática, interação hidrofóbica ou interações por pontes de hidrogênio. As interações hidrofóbicas constituem as mais fortes devido à penetração do polímero

nas bicamadas. Dependendo das interações envolvidas, podem ocorrer interações que promovam a uma separação ou não de fases. A separação completa de fases é indesejável, pois ocorre a insolubilização do complexo polímero-vesícula, dificultando o controle de tamanho e aplicações.

Nosso grupo de pesquisa avaliou a complexação entre lipossomas cationicos extrudados compostos de 50%EPC/25% DOPE/25% DOTAP) com o ácido hialurônico (6 e 16 kDa), e verificou que é possível modular o diâmetro da partícula pela massa molar do polímero. O sistema composto de lipossoma e ácido hialurônico 16 kDa, também foi testado em transfecções em células HeLa e mostrou um aumento nos resultados de transfecção.

Utilizando estes resultados, verificou se a viabilidade deste sistema para o uso como vacina gênica para leishmaniose com parte do projeto de pesquisa de mestrado da aluna Mirian França no Laboratório de Imunologia do Instituto Carlos Chagas /UFRJ sob coordenação da Profa.Dra. Bartira Rossi.

### **3. MATERIAIS**

#### ***a. Materiais para produção das nano partículas***

O hialuronato de sódio (AH) nas massas molares 5-10KDa, 10-20 KDa foram adquiridos da Lifecore e AH de 100 KDa foi adquirido da Galena. Os lipídeos fosfatidilcolina natural de ovo (EPC) 96% de pureza, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) 99,8% de pureza e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) 98% de pureza foram adquiridos da Lipoid (Alemanha); Clorofórmio e etanol foram adquiridos da Sigma; água para injeção da Baker. Os demais reagentes foram de padrão analítico.

### **4. METODOS**

#### ***a. Produção de lipossomas catiônicos e incorporação de DNA:***

Os lipossomas catiônicos foram produzidos a partir dos protocolos já estabelecidos para lipossomas na composição lipídica EPC/DOTAP/DOPE 50:25:25% molar (Torre, 2006, de LA Torre et al. 2009, Rosada et al., 2008),

aplicando o método de Bangham (1965), seguido de extrusão em membrana de policarbonato (100 nm), para gerar os lipossomas “vazios” com diâmetro médio de aproximadamente 100 nm. Em seguida estes lipossomas foram congelados em nitrogênio líquidos e liofilizados durante 24h. Em seguida realizou-se a hidratação, sob condições controladas, gerando os lipossomas catiônicos vazios de diâmetro médio de 750 nm. Para todos os dois casos, os lipossomas foram preparados em água. A associação/completação do DNA na superfície externa dos lipossomas foi realizada através da adição da solução de DNA na solução lipossomal, sob agitação com vórtice durante 40 segundos, com temperatura entre 0 e 4°C, gerando a nanoestrutura final (Rosada et al.2008). A razão molar de cargas na qual os lipossomas catiônicos e DNA foram incorporados foi calculada conforme equação 1 (Koltover et al., 1998)

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

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.

A razão molar de cargas, apresentada na Equação 1, foi estabelecida considerando-se a proporção molar de cargas positivas dada pela quantidade em moles de lipossoma catiônico(DOTAP) e pela proporção molar de cargas negativas do DNA. Para a definição das cargas molares positivas, tem-se que 1 mol de DOTAP possui 1 mol de cargas (lipídeo monocatiônico). As cargas molares negativas, provenientes do DNA, em da relação de 1 micrograma de DNA possui 3 nmoles de cargas negativas.

**b. Recobrimento dos lipossomas catiônicos, incorporados com DNA, com ácido hialurônico**

A associação entre os lipossomas catiônicos “vazios” e contendo DNA foi realizado a partir da incubação da suspensão coloidal destas estruturas coloidais com solução de ácido hialurônico em água (HA 0,3% m/v). Avaliação da ordem de complexação, e concentração das soluções lipídicas e de ácido hialurônico nas partículas.

A quantidade de HA nos sistemas é referenciada ao longo do texto em porcentagem de HA em massa presente em base seca, que é calculado massa de HA dividido por massa de lipídios e massa de HA multiplicado por 100.

Para o caso dos sistemas pseudo-ternários, a quantidade HA também é referenciada em porcentagem em massa de HA considerando no cálculo apenas a massa de HA e de lipídios e não considerando massa de água e de DNA. O DNA é sempre referenciado na razão molar de cargas em relação ao lipossoma catiônico conforme equação 1.

**c. Caracterização físico-química das nanopartículas**

**i. Diâmetro hidrodinâmico e Potencial zeta**

As nanoestruturas funcionais “vazias” ou contendo o DNA foram caracterizadas nos seguintes aspectos: diâmetro médio e distribuição de tamanhos, densidade de carga (potencial zeta), utilizando equipamento Zetasizer da Malvern.

O diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos dos sistemas com partículas abaixo de 10 000 nm foram determinados por espalhamento da luz, através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) utilizando laser de alta potência, em equipamento Malvern, Zetasizer Nano ZS.

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 se difundem mais rápido que as maiores e a taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão. 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, 1993), conforme a equação 2:

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6 \cdot D \cdot \eta}$$

**Equação 2**

Em que,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $D$  é o coeficiente de difusão das partículas e  $\eta$  é a viscosidade do solvente.

As medidas foram realizadas em ângulo de  $173^\circ$  em relação ao feixe de raio laser (He-Ne) incidente. A partir da intensidade de luz espalhada, pode-se estimar o diâmetro médio da dispersão coloidal, através da média ponderada entre os diâmetros hidrodinâmicos e as respectivas porcentagens populacionais. Os resultados podem estar dispostos em relação à distribuição de intensidade de luz espalhada, distribuição de número de partículas e diâmetro médio cumulativo das partículas. O diâmetro hidrodinâmico médio cumulativo é uma média cumulativa dos diâmetros por intensidade de luz espalhada. Apesar de não apresentar um valor absoluto, este pode ser usado para comparação entre resultados obtidos através de uma mesma técnica e que apresentam mais de uma população de tamanhos. Explicar distribuição de tamanhos em intensidade e número. Mencionar qual a distribuição que você utiliza neste trabalho.

O potencial zeta foi medido em água, a  $25^\circ\text{C}$  como meio de dispersão, em equipamento Malvern, Zetasizer Nano ZS. O potencial zeta 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 equilibrar de forma dinâmica a distribuição de cargas entre a superfície da partícula e o seio da solução. A camada Stern é a mais próxima e a primeira a envolver o colóide e é formada pelos contra-íons (de carga oposta à da superfície da partícula), tendo como principal característica uma grande rigidez. A camada difusa também é formada

por contra-íons que estão em equilíbrio dinâmico com os co-íons, 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.

### ***ii. Eletroforese***

A caracterização do DNA plasmídeo e dos complexos foi feita em gel de agarose quanto à, avaliação da razão de cargas na qual todo o plasmídeo encontra-se associado à estrutura lipídica.

O gel de agarose utilizado nos testes de eletroforese foi preparado em solução tampão TAE 1 X (40 mM TRIS-Acetato, 1 mM EDTA) com 0,8% de agarose. As amostras preparadas foram adicionadas em poços e a corrida eletroforética foi realizada sob tensão de 70 V, durante aproximadamente 2 horas. Após esta etapa o gel permaneceu por 20 minutos em solução Brometo de Etídio (EtBr), o qual possibilita a visualização das bandas de EtBr-DNA sob luz ultravioleta. O gel foi então deixado imerso em água por 15 minutos, para enxágüe posteriormente ser fotografado sob luz ultravioleta, gerando as imagens.

### ***iii. Testes de crioprotetor***

Inicialmente, testou se o ácido hialurônico poderia atuar como crioprotetor. Preparou formulações de lipossoma extrudado (50% EPC/25%DOPE/25%DOTAP conforme descrito no item a, porém sem o DNA em diferentes proporções de ácido hialurônico 16 kDa (1%, 60%, 80%). Foi realizado o controle de diâmetro e potencial zeta das partículas antes de liofilização e posteriormente as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Após 24 horas no liofilizador, as amostras foram

hidratadas em três etapas lentas sendo a adicionado inicialmente 20% do volume de água para completar o volume original, e numa segunda e numa terceira etapa foi adicionado 30%, e o diâmetro e potencial zeta foram mensurados e comparados.

Posteriormente, foi testada a quantidade do crioprotetor trealose em diferentes proporções 1:5; 1:6; 1:7; 1:8 (massa de lipídeo/ massa de trealose) para as partículas positivas (lipossoma + HA 16kDa 1%) e para partículas negativas (lipossoma + ácido hialurônico 16kDa 30%). A liofilização e o controle foram realizados conforme descrito anteriormente

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os ensaios *in vivo* envolvendo a eficiência da vacina gênica contendo o plasmídeo LACK DNA já são estabelecidos pelo grupo de pesquisa da UFRJ (Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto Carlos Chagas Filho – UFRJ, coordenado pela Profa. Dr. Bartira Rossi Bergmann). O requisito de concentração é de 30 µg de DNA para uma dose intranasal/animal. O volume máximo a ser aplicado é de 30 µL (limite máximo aceitável para aplicação nos animais). Desta forma, a concentração de DNA LACK na formulação final deve ser de 1 µg/µL.

Nos estudos estabelecidos anteriormente utilizando o DNA plasmídeo modelo determinaram que a melhor condição para a proporção entre DNA (cargas positivas) e lipossomas catiônicos (cargas negativas) é que a razão molar de cargas ( $R_{+/-}$ ) seja 3. A fim de se avaliar a influência de diferentes quantidades de HA nas formulações, várias razões mássicas HA/lipídeo foram preparadas, baseadas nos estudos realizados anteriormente. No entanto, como as complexações realizadas nos estudos anteriores foram realizadas em condições diluídas (0,30 µg de DNA/ul), em concentrações muito menores que o exigido (1,25 µg de DNA /ul) para os ensaios *in vivo*, houve a necessidade de readequação da concentração final destes complexos.

Desta forma, para atingir os requisitos de concentração de DNA estabelecidos para aplicação *in vivo*, avaliou-se inicialmente a possibilidade de se elevar a concentração dos lipossomas de 16 mM para 102 mM, para depois realizar as complexações em condições concentradas. No entanto, a solução lipossomal com

alta concentração obtida não apresentava repetibilidade no processo. Sendo assim, optou-se por produzir o lipossoma a 16 mM, realizar a complexação com o DNA e HA de forma diluída, em protocolo já estabelecido anteriormente, seguido de etapa de liofilização e reconstituição no momento do uso.

A fim de se ajustar a concentração final para a aplicação *in vivo*, a estratégia estabelecida foi utilizar um crioprotetor e desidratar as formulações e rehidratar (através de liofilização) na concentração apropriada. Como estratégia de crioproteção, o HA foi a primeira molécula a ser testada, uma vez que a literatura já reporta esta aplicação (Peer, et al 2003). Neste estudo, Peer avaliou a capacidade crioprotetora de lipossomas formados por lipídios com o ácido hialurônico ligado covalentemente (DOPE derivatizado). Desta forma, os complexos pseudo-binários lipossoma (100 nm)-HA foram liofilizados na presença de excesso de HA. As amostras não mantiveram os diâmetros após hidratação conformetabela 1.

**tabela 1: Características físico químicas antes de depois de liofilizar os complexos LC 100 NM /HA 6 e 16kDa) diferentes proporções em massa**

Tipo de associação	Diâmetro médio (nm )		Potencial Zeta (mV)	
	Antes de liofilizar	Após liofilizar	Antes de liofilizar	Após liofilizar
ECL/HA 16 kDa 80%	207	3344	-35,6	-40,8
ECL /HA 16 kDa 60%	206	3778	-40,3	-36,9
ECL/HA 16 kDa 1%	204	2207	35,4	36,8

A partir da tabela 1 pode-se observar que o excesso de HA não permite o efeito de crioproteção, pois após a rehidratação, os diâmetros das partículas apresentaram valores elevados, inviabilizando aplicações como vacina.

Em segunda etapa, utilizou-se como crioprotetor a trealose. As razões mássicas avaliadas foram 1:5; 1:6, 1:7; 1:8 (lipídeo/trealose), baseada em estudos de nosso laboratório de pesquisa conforme tabela 2.

**tabela 2: Características físico químicas antes de depois de liofilizar os complexos LC 100 NM /HA 16kDa com 1%(partícula positiva) e 30%(partícula**



**negativa) mais o crioprotetor (trealose) em diferentes proporções em massa em relação a massa de lipídio**

Tipo de associação	Diâmetro médio (nm ± SD)		Potencial Zeta (mV ± SD)		Polidispersidade (± SD)	
	Antes liofilizar	Após liofilizar	Antes liofilizar	Após liofilizar	Antes liofilizar	Após liofilizar
HA 1% prop 1:5	288 ± 19	600 ± 7	33,2 ± 0,4	46,2 ± 3,4	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
HA 1% prop 1:6	361 ± 6	357 ± 20	37,3 ± 0,6	58,2 ± 1,4	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
HA 1% prop 1:7	287 ± 25	369 ± 8	31,4 ± 0,9	61,7 ± 1,5	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
HA 1% prop 1:8	298 ± 42	202 ± 6	35 ± 2	58,2 ± 1,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
HA 30% prop 1:5	126 ± 114	>10000	-32 ± 2	-40,9 ± 1,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
HA 30% prop 1:6	198 ± 52	>10000	-32,5 ± 0,5	-39,3 ± 1,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
HA 30 prop 1:7	138 ± 87	>10000	-32,6 ± 0,6	-38,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
HA 30% prop 1:8	206 ± 51	>10000	-33,7 ± 0,2	-39,3 ± 0,9	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
HA 30% prop 1:15	199 ± 6	>10000	-28 ± 1	-27,8 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1

(i) A proporção lipossoma e trealose é dada em massa sendo o primeiro algarismo referente a massa de lipídio e o segundo algarismo referente a massa de trealose adicionada

Desta forma, a quantidade mássica de trealose apropriada em cada experimento foi adicionada aos complexos pseudo-ternários já obtidos em condições diluídas. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e rehidratadas sob condições controladas de agitação e visando elevar a concentração total, para atender aos requisitos de dosagem. Após a rehidratação, os diâmetros foram avaliados e a proporção 1: 6 foi considerada a ideal após hidratação em três etapas para a concentração de 1,25 (g de DNA LACK / 1 µl de vacina para os

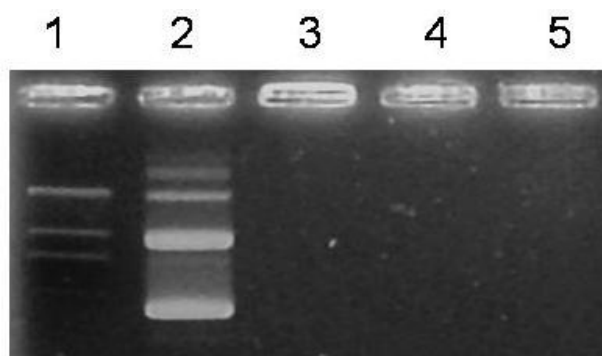
testes *in vivo*. No entanto, este controle do diâmetro após a rehidratação ocorreu apenas para as partículas com potencial zeta positivo.

A partir deste estudo, algumas amostras foram preparadas em condições estéreis e enviadas para o Instituto Carlos Chagas – UFRJ para avaliação preliminar *in vivo*. Ainda não possuímos respostas dos testes. As amostras enviadas estão em acordo com a tabela 3:

**tabela 3: Características Físico- Químicas das formulações enviadas para testes *in vivo*.**

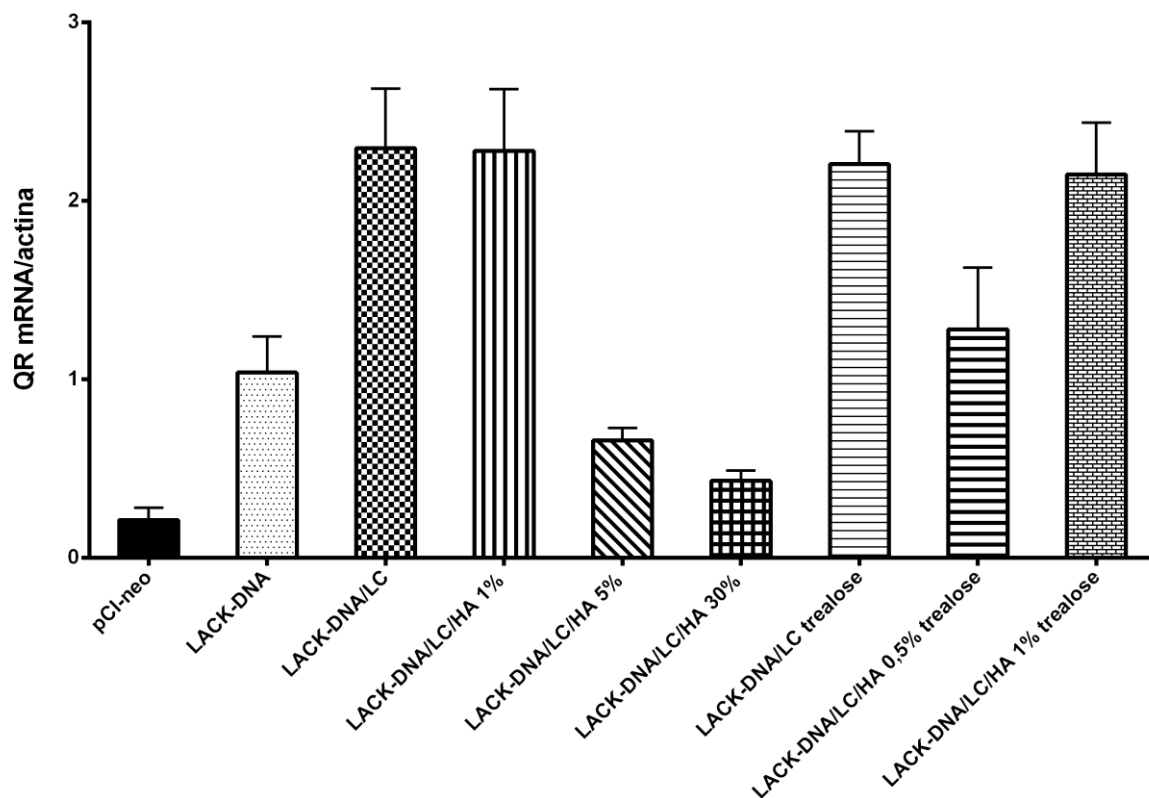
Amostra	Diâmetro médio (nm ± SD)	Potencial Zeta (mV ± SD)
ECL-LACK DNA	453 ± 25	46,7 ± 0,9
ECL –LACK DNA/ HA 6 kDa 0,25%	446 ± 5	42,7 ± 0,6
ECL –LACKDNA/ HA 16 kDa 0,25%	479 ± 13	48,0 ± 0,2
ECL –LACKDNA/ HA 16 kDa 1%	367 ± 2	48 ± 1

Com o objetivo de verificar se o LACKDNA encontrava se ainda retido na estrutura lipossomal após a complexação do sistema binário ECL-LACKDNA com o ácido hialurônico foi realizado o teste de eletroforese em gel de agarose, o qual comprovou que o DNA continua retido (Figura 1).



**figura 1: Eletroforese em gel de agarose (0.8%) do sistema pseudo ternário ELC-DNA LACK/HA em diferentes proporções de AH. Linha 1) Marcador Molecular 2) DNA LACK; 3) LC-DNA LACK/HA 6kDa 1%; 4) LC-DNA LACK/HA 16kDa 1%; 5) LC-DNA LACK/HA 16 kDa 30%**

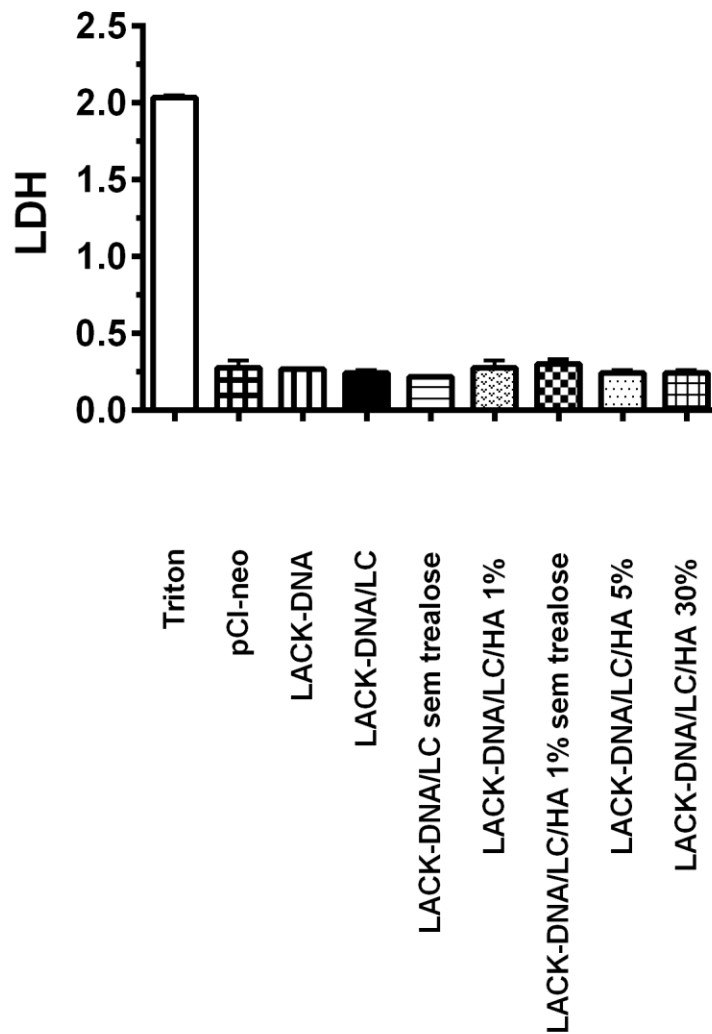
Os ensaios biológicos *in vivo* estão sendo conduzidos pelo grupo de pesquisa da UFRJ (Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto Carlos Chagas Filho – UFRJ, coordenado pela Profa. Dr. Bartira Rossi Bergmann, os resultados são apresentados nas figuras seguintes como parte da dissertação de mestrado da aluna Mirian França de Mello.



**figura 2: Expressão de transcritos de LACK: macrófagos transfectados com 6 µg de LACK-DNA em diferentes formulações. Após o tempo de incubação, o RNA foi extraído das células, tratados com DNase e usado para qRT-PCR usando β-actina como controle endógeno. O grupo incubado com LACK-DNA livre foi usado como amostra de referência para o cálculo de QR e tem QR=1. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 em relação ao LACK-DNA.**

Na avaliação da expressão de mRNA LACK, demonstrada na figura 2, confirmamos a capacidade da formulação lipossomal LACK-DNA/LC mostrou aumentar a taxa de transfeção celular em relação ao LACK-DNA livre. O mesmo efeito foi observado na formulação LACK-DNA/LC/HA 1%. No entanto aumentando a quantidade de HA nas formulações para 5 e 30% houve uma

redução na expressão de mRNA LACK, devido ao caráter aniônico destas formulações, o que poderia estar levando a uma repulsão eletrostática com a membrana celular, também aniônica. Por outro lado a inclusão do peptídeo de sinalização nuclear NLS aumentou em 4 vezes a transfecção em relação ao LACK-DNA. Quanto a inclusão da trealose nas formulações, esta parece não ter influenciado na transfecção celular como esperado.



**figura 3: Citotoxicidade das formulações lipossomais: Os macrófagos ( $3 \times 10^6$ ) foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  com as formulações indicadas contendo  $6 \mu\text{g}$  de LACK-DNA e nas proporções indicadas na tabela 3 por 6 horas, quando**

as células foram lavadas e incubadas por mais 18 horas em meio de cultura. A quantidade de LDH foi medida no sobrenadante após o tempo total de 24 horas. A liberação espontânea de LDH (meio somente) foi de 10% do Triton. Média  $\pm$  SD (n=3).

Todas as formulações foram avaliadas em termos de citotoxicidade através do ensaio de liberação específica da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de macrófagos transfectados com LACK-DNA nas diferentes formulações. Nenhuma formulação contendo 6  $\mu$ g de LACK-DNA revelou-se tóxica, com níveis de viabilidade celular semelhantes com os macrófagos que foram transfectados com LACK-DNA livre ou pCI-neo sem inserto de LACK e também macrófagos apenas incubados com meio de cultura.

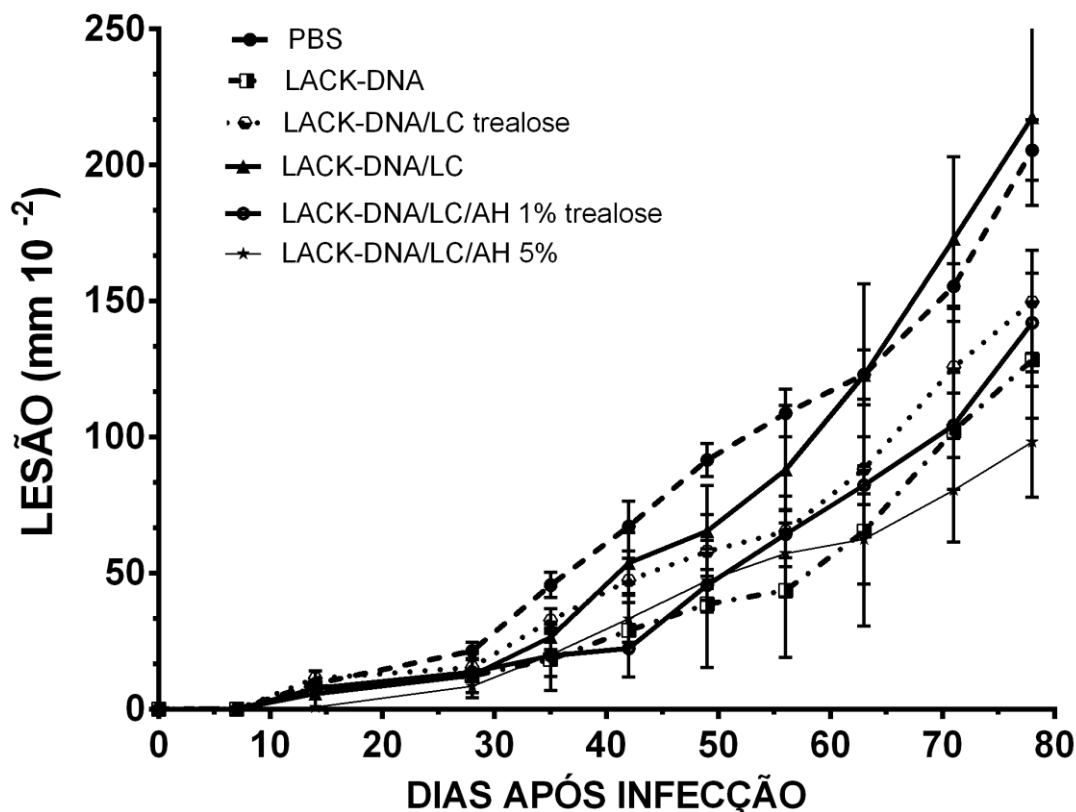


figura 4: Eficácia da vacina LACK-DNA em diferentes formulações contra infecção por *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c n=5 foram pré-imunizados com duas doses de 30  $\mu$ g cada de LACK-DNA nas diferentes formulações em intervalos de 1 semana entre as doses. Uma semana após

a última imunização intranasal os animais foram infectados na pata direita com  $2 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* josefa na fase estacionária. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado através da medição da pata e expresso em média com erro padrão, do  $\Delta$  obtido ( $\Delta$  = leitura da espessura do dia avaliado – leitura obtida no dia da injeção).

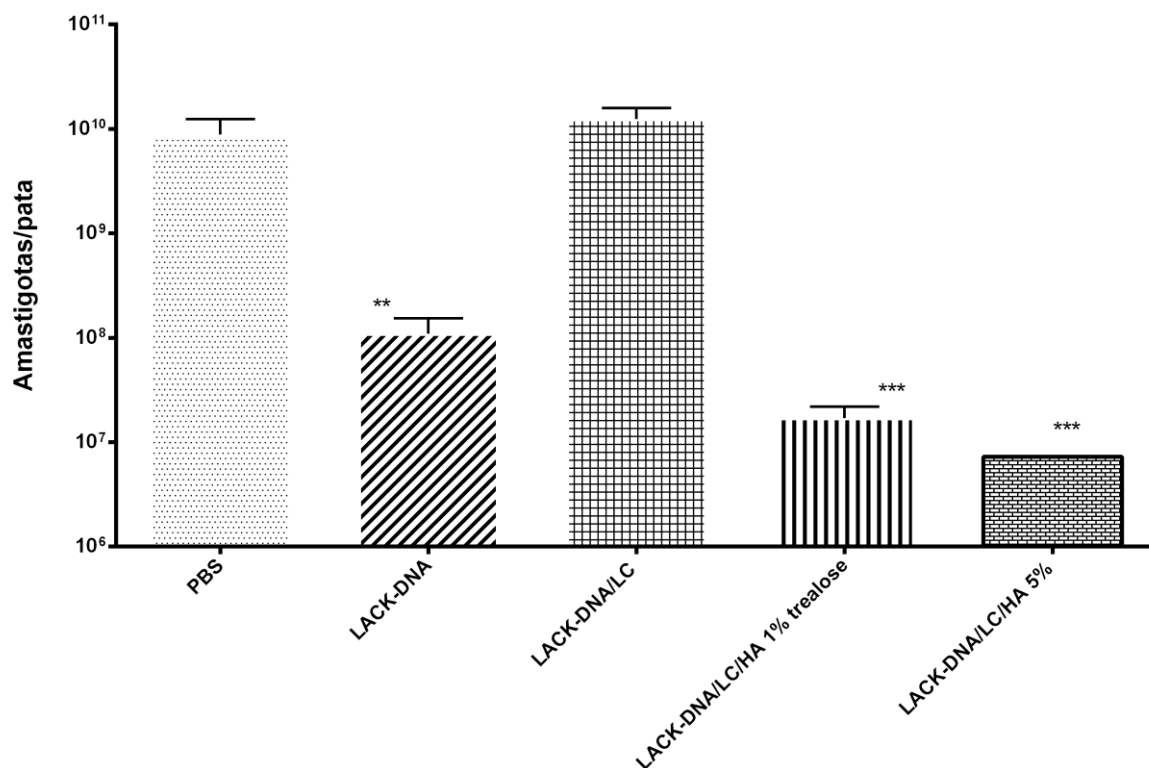


figura 5: Carga parasitária de camundongos BALB/c n=5 (suspeitos de não serem isogênicos) infectados com *L. amazonensis* vacinados com diferentes formulações lipossomais. Após o final do acompanhamento da lesão, os animais foram submetidos à eutanásia e avaliada carga parasitária no macerado de lesão pelo método de diluição limitante (LDA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD (n=5). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo PBS.

Devido as características mucoadesivas do ácido hialurônico foi realizado o teste in vivo com as formulações LACK-DNA/LC/AH 1% e LACK-DNA/LC/AH 5%. Novamente a formulação LACK-DNA/LC simples aumentou a expressão de transcritos de LACK (figura 5), corroborando com dados *in vitro* (figura 2), quando

comparado com o grupo LACK-DNA livre. Já a formulação contendo 1% de AH, LACK-DNA/LC/AH 1%, também aumentou a expressão de mRNA LACK quando comparado com a vacina livre. Porém não foi diferente do efeito já obtido com LACK-DNA/LC simples. E quando aumentamos a percentagem de AH para 5% tivemos um resultado diferente do observado no experimento de transfecção *in vitro*, pois obtivemos uma melhora significativa na expressão de mRNA LACK tanto em relação ao LACK-DNA livre e também em relação ao grupo LACK-DNA/LC simples com uma redução significativa na carga parasitária e menor lesão. A melhora da expressa na formulação está de acordo com outros estudos com microesferas contendo ácido hialurônico foram empregadas como adjuvantes de vacina intranasal devido duas propriedades mucoadesivas contra gripe. Neste estudo a formulação contendo HA induziu maior imunogenicidade (Singh *et al.*, 2001). O experimento *in vivo* nos revelou que o efeito do AH é mais pronunciado em termos de mucoadesão e penetração epitelial, sendo , desta forma, o uso do ácido hialurônico na formulação vantajoso na vacinação intranasal. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, confirmando que o ácido hialurônico aumenta a imunogenicidade por aumentar a captação devida suas propriedades mucoadesivas.

## **6. Conclusão**

O objetivo deste trabalho foi a formulação do sistema nanoparticulado composto de lipossoma e ácido hialurônico para aplicação pela rota nasal como vacina gênica para o combate a Leishmaniose. Com base em estudos posteriores conforme descritos nos capítulos 3 e 4 e nos estudos realizados com o LACKDNA, foram testadas a complexação do LACKDNA ao sistema ECL+HA 16kDa. A concentração máxima de DNA obtida nas formulações foi de 1,25 micrograma/microlitro utilizando da trealose como crioprotetor na proporção 1:6 (massa de lipídio/massa de trealose) para os testes *in vivo* e *in vitro*.

Este trabalho mostrou que é possível otimizar a eficácia vacinal do LACK-DNA através do seu encapsulamento em lipossomas catiônicos. A funcionalização com ácido hialurônico AH 5%, apesar de não promover aumento da transfecção

celular, *in vitro*, mostrou potencial para promover uma melhor eficácia *in vivo*, provavelmente devido ao aumento da mucoadesividade do ácido hialurônico.

A funcionalização da formulação lipossomal de LACK-DNA (LACK-DNA/LC) com NLS e com AH 5% parece ser uma estratégia promissora para melhorar a eficácia da vacina LACK-DNA intranasal contra a leishmaniose cutânea. No entanto um experimento de eficácia vacinal irá confirmar que esta formulação seja realmente eficaz contra infecção por *L. amazonensis*.

## 7. Referências

- ALMEIDA, A.J. H.O. ALPAR, Nasal delivery of vaccines, **J. Drug Target.** 3 (1996) 455–467.
- ANTUNES, F.E; MARQUES, E.F; MIGUEL, M.G; LINDMAN, B; **Polymer vesicle association**, Advances in Colloid and Interface Science, 147-148- 2009, pp 18-35
- 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.
- DAVIS SS. Nasal vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, pp. 21—42, 2001.
- DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; ALVES, C.R.; COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; BERTHO, A.L.; TOLEDO, V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O. & MENDONCA, S.C. (1999). Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*, 17 (9-10):1179–1185.
- DE ROSA, G.; LA ROTONDA, M. I. Nano and Microtechnologies for the Delivery of Oligonucleotides with Gene Silencing Properties. **Molecules**, v.14, p.2801-2823, 2009.
- DNDi/*Drugs for Neglected Diseases initiative*,  
<[http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas\\_negligenciadas.aspx](http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx), 2008.>
- FERNÁNDEZ A.; VELASCO D.; LUEIRO F.; BOU G. (2008). Antifungal activity of posaconazole and caspofungin in yeast causing invasive fungal infection



- (2002-2003). E-test system evaluation. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 26(2):82-4.
- GOMES, D. C. O.; PINTO, E. F.; MELO, L. D. B.; LIMA, W.P.; LARRAGA, V.; LOPES, U.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. **Vaccine** , v.25, pp. 2168–2172, 2007.
- ILLUM, L.; FARRAJ, N.F.; FISHER, A.N.; GILL,I.; MIGUELITA,M.; BENEDETTI, L.M.. Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 29, p. 133-141, 1994.
- KHARENKO, E.A.; LARIONOVA, N. I. ; DEMINA, N. B. Mucoadhesive drug delivery systems (review) **Pharmaceutical Chemistry Journal Vol. 43, No. 4, 2009**
- 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.
- LABAS, R.; BEILVERT, F.; BARTEAU, B.; DAVID, S.; CHE`VRE, R.; PITARD, B. Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. **Genetica**, v.138, p. 153–168, 2010.
- LASIC, D.D. **Liposomes: From Physics to Applications**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1993. 575 p.
- LIAO, Y,H, S.A. JONES, B. FORBES, G.P.MARTIN, M.B. BROWN, Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery, **Drug Deliv.** 12 (2005) 327–342.
- LIRA, R.; SUNDAR,S.; MAKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D.. Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar Is Due to the Emergence of Antimony□Resistant Strains of Leishmania donovani . **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p. 564–567, 1999.
- LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, **Adv.Drug Deliv. Rev.** 57 (2005) 1595–1639.

- MARZOCHI, K. B. F.; MARZOCHI, M. C. A.; SILVA, A. F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONORT, E. M. & MODABBER, F. (1998). Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93(2): 205-212
- PARTIDOS, C.D. Intranasal vaccines: forthcoming challenges. **Pharm Sci Technol Today**, v.3, pp. 273—80, 2000.
- PEER, D; FLORETIN, A; MARGILIT, R; Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of target unilamellar liposomes; **Biochimica et Biophysica Acta** v 1612,p 76-82, 2003
- PRESTWICH, G.D, K.P. Vercruyse, Therapeutic application of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives, **Pharm. Sci. Technol. Today** 1 (1998) 42–43.
- PRITCHARD, K.; LANSLEY, A.B.; MARTIN, G.P.; HELLIWELL, M.; MARRIOT, C.; BENEDETTI, L.. Evaluation of the hyaluronan derivatives: detachment weight and mucociliary transport rate studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 137-145, 1996.
- RODRIGUES JUNIOR, J. M. ; LIMA, K.M. ; CASTELO, A. A. M. C. ; MARTINS, V. L. D. B. ; SANTOS, S.A.; FACCIOLI, L. H. ; SILVA, C.L.. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?. **Jornal de Pneumologia - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 30, n. 4, p. 378-387, 2004.
- ROSADA, R.S., TORRE, L.G.; FRANTZ, F.G. et al. Protection Against Tuberculosis by a Single Intranasal Administration of DNA-hsp65 Vaccine Complexed with Cationic Liposomes **BMC Immunology** 9:38, 2008.
- TORRE, L. G., Desenvolvimento de vacina gênica veiculada em adjuvantes lipídicos para tratamento da tuberculose. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. 2006.
- TORRE, L. G.; ROSADA, R.S.; TROMBONE, A.P.F., FRANTZ, F.G.; COELHO-CASTELO, A.A.M., SILVA, C.L.; SANTANA, M.H.A. Synergy between

structural stability and dna-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE vesicles and DOTAP/DOPE lipoplexes. **Colloids and Surfaces**, v.73, p. 175-184, 2009.

UGWOKE M.I. R.U. AGU, N. VERBEK, R. KINGET, Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 57 (2005) 1640–1665.

VÉLEZ I.D.; GILCHRIST K.; ARBELAEZ M.P.; ROJAS C.A.; PUERTA J.A.; ANTUNES C.M.; ZICKER F.; MODABBER F. (2005). Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 99(8):593-8.

ZHOU A,S, Shigeru Kawakami a, Fumiyoshi Yamashita a, Mitsuru Hashida. Intranasal administration of CpG DNA lipoplex prevents pulmonary metastasis in mice *Cancer Letters* 287 (2010) 75–81

---

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS

---

Com o presente trabalho, que, prioritariamente, visou o desenvolvimento de da formulação composta de lipossomas e ácido hialurônico para terapia gênica, pôde-se concluir que:

- Os complexos formados por lipossomas catiônicos e ácido hialurônico podem ter seus diâmetros modulados alterando a massa molar do polímero;
- O biopolímero ácido hialurônico não permea na bicamada lipídica porém a perturba e torna o sistema mais instável, isto é, aumentando a pressão de colapso e reduzindo a temperatura de transição de fases;
- O sistema nanoparticulado composto de lipossoma extrudados 100 nm (50% EPC/ 25% DOPE/25% DOTAP) e ácido hialurônico 16kDa é uma alternativa viável para transfecção em células HeLa;
- O ácido hialurônico não expulsa o DNA do sistema lipossomal;
- O ácido hialurônico protege o DNA como observado pela redução da acessibilidade a medida que aumenta a quantidade de Ácido hialurônico na formulação ECL-DNA-HA16kDa pelo teste com a sonda de fluorescência;
- A presença de ácido hialurônico reduz a carga parasitárias, as lesões e não se apresenta citotoxicidade sendo indicada como uma estratégia promissora de vacina gênica para leishmaniose

---

## CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

Para a continuação de pesquisas futuras no que tange ao desenvolvimento de sistemas compostos de lipossomas e ácido hialurônico destinados à terapia e à vacinação gênica, sugere-se o seguinte:

- Estudar a complexação de lipossomas de 100 nm produzidos por métodos que permitem o escalonamento do processo com o ácido hialurônico;
- Estudar a interferência do DNA na monocamada lipídica;
- Estudar a complexação do lipossomas catiônico 50%EPC/25% DOPE/25% DOTAP 100 nm com ácido hialurônico de massas molares maiores que 16kDa;
- Conduzir experimentos de complexação entre lipossomas catiônicos e HA, utilizando análises de SAXS que detalhem a modificação estrutural causada pela diferente forma de empacotamento obtida em cada proporção de HA.
- Avaliar a viabilidade de concentrar mais as formulações compostas de ECL+HA 16kDa+DNA para concentrações superiores que 1,25 micrograma de DNA/microlitro;