Daniel Campos Silva

Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica a células de mamífero

São Paulo

2015

Daniel Campos Silva

Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica a células de mamífero

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2015

Daniel Campos Silva

Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica a células de mamífero

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

São Paulo

2015

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catalogação-na-publicação

Silva, Daniel Campos
Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica a células de mamífero / D. C. Silva -- versão corr. -- São Paulo, 2015.
79 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Caracterização de Nanopartículas 2.DNA Plasmidial 3.Protamina 4.Entrega Gênica 5.Vacinas de DNA I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

À minha família por todo amor e apoio

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível graças à colaboração direta e/ou indireta de muitas pessoas. Manifesto gratidão a todas elas e de maneira particular:

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni, pela preciosa orientação neste trabalho, sua confiança e sua dedicação, pelo muito que me ensinou nas aulas, em seus artigos e em suas dissertações, pelo exemplo de pessoa e fraternidade.

- À Stella Maria Ikegami Ottengy pela sua ajuda com a realização dos experimentos;

- Ao Rafael Ferraz Alves pela sua disponibilidade, prestatividade e pela sua atenção;

- Ao Luís Fernando Mercier Franco pela ajuda nas disciplinas e pela sua disposição.

- À Daniela Flores Teruya Astudillo, Sara Isabel Borges Cardoso e ao Rafael da Gama Ferreira pela atenção e companheirismo;

- Ao Professor Sandro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo uso do Citômetro de Fluxo;

- Em especial à Renata Albuquerque, FCF-USP, pelo suporte técnico;

- À minha família pela dedicada paciência e estímulo, estando ao meu lado me apoiando e me incentivando;

- Em especial, à minha mãe por estar ao meu lado em todas as horas, pelos incentivos e apoio, ao meu irmão pelo companheirismo, amizade, paciência e por seus conselhos, e ao meu pai por todo o suporte emocional, financeiro, pelos seus conselhos e dedicação, porque sem eles, seria muito difícil esta caminhada;

- Ao CNPq, pela bolsa de estudos e também pelo auxílio financeiro à pesquisa.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,

nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

Em estudos de terapia gênica e vacinação por DNA, a eficiência e a segurança dos vetores que transportam o material genético terapêutico possuem papel fundamental. Vetores não virais são considerados mais seguros, mas menos eficientes em relação aos vetores virais. Em parte, isso se deve à falta de estudos sistemáticos e comparativos no que diz respeito às características físico-químicas desses vetores quando em soluções biológicas e o efeito delas sobre a eficiência de entrega gênica. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do pH, da força iônica e do tipo tampão de complexação sobre as características físico-químicas de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipofectamina, visando à entrega gênica para diferentes linhagens celulares. Para isso, nanopartículas formadas em diferentes condições foram caracterizadas através de ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta. Os estudos indicaram que o pH, a força iônica, o tipo de tampão e a presença de meio de cultura e soro no ambiente de complexação alteram significativamente o tamanho, a polidispersidade e o potencial zeta das partículas formadas. Finalmente, buscou-se avaliar o efeito dessas características sobre a eficiência de transfecção *in vitro* de células de macrófagos IC21 e células HeLa. Os estudos de transfecção em células Hela indicam que tanto a composição como as condições de formação das partículas influenciam significativamente a eficiência de transfecção.

Palavras-Chaves: Entrega gênica; Protamina; Lipofectamina; Nanoprtículas; Vetores não virais.

ABSTRACT

In gene therapy and DNA vaccination studies, the efficiency and safety of the vector carrying the therapeutic gene play a fundamental role. Non-viral vectors are considered safer but less effective when compared to viral vectors. In part, this is due to the lack of systematic and comparative studies regarding the physicochemical characteristics of these vectors when prepared in biological solutions and their effect on gene delivery efficiency. The objective of this study was to evaluate the effect of pH, ionic strength and type of complexation buffer on pDNA-protamine and pDNA-protamine-lipofectamine nanoparticles aiming at gene delivery to different cell lines. In order to achieve this goal, nanoparticles formed under different conditions were characterized by dynamic light scattering test (DLS) and zeta potential. Our studies indicated that the pH, the ionic strength, buffer type, and the presence of culture medium and serum in the complexation environment all significantly affect the size, polydispersity, and zeta potential of the particles formed. Finally, we evaluated the effect of these characteristics on the efficiency of transfection *in vitro* using HeLa cells and macrophages IC21. The transfection studies, especially using Hela cells, indicated that both, nanoparticle composition and the conditions of complex formation, significantly affect the efficiency of the transfections.

Keywords: Gene delivery; Protamine; Lipofectamine; Nanoparticles; Non viral vectors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Testes clínicos para tratamento de doenças utilizando terapia gênica, registrada na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015). 5

Figura 2. Testes clínicos para tratamento de doenças utilizando terapia gênica registrada na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015). 6

Figura 3. Vetores utilizados para transporte de material genético (DNA/RNA) em ensaios clínicos registrados na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015). 8

Figura 4. Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação do pDNA por nucleases extracelulares, (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação de pDNA no endossoma; (5) escape do endossoma; (6) degradação de pDNA por nucleases citosólicas; (7) entrada no núcleo; (8) transcrição; (9) exportação do mRNA; (10) tradução. 9

Figura 5. Estrutuas moleculares dos lipídeos DOSPA (em cima) e DOPE (em baixo), utilizados na forumalção do reagente de transfecção Lipofectamina™ (Life Technologies) (Patente US N° 5.334.761). 16

Figura 6. Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido. Retirado de Junior (1999). 19

Figura 7. Estruturas químicas dos tampões fosfato (esquerda) e Hepes (direita), mostrando a quantidade e posição das respectivas cargas elétricas em pH neutro. 24

Figura 8. Mapa do plasmídeo pVAX1GFP descrito em detalhe por Azzoni *et al*. (2007). O plasmídeo foi desenvolvido originalmente com a denominação pVAX1 pela empresa Invitrogen para utilização em estudos de vacinação por DNA. 28

Figura 9. Análise qualitativa da purificação do pDNA em gel de agarose (0,8%). Legenda: 1) Marcador de massa molecular (1 kb); 2) plasmídeo modelo pVAX1GFP. 35

Figura 10. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes pHs em tampão fosfato de sódio. O diâmetro é reportado em número. 39

Figura 11. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes pHs em tampão Hepes. O diâmetro é reportado em número. 41

Figura 12. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes

concentrações de NaCl (50 mM, 100 mM e 250 mM) em tampão Hepes pH 7,5. O diâmetro é reportado em número. Os ensaios foram realizados em triplicata.....44

Figura 13. Eficiência de transfecção das células de macrófagos IC21 utilizando-se os complexos binários pDNA:protamina em diferentes relações mássicas (1:0,9; 1:2 e 1:5), além do lipoplexo pDNA:Lipofectamina (cinza claro). Os complexos foram preparados em tampão Hepes 40 mM a valores de pH 6,5 (cinza médio) e pH 8,5 (preto). Os valores apresentados representam a média de três poços transfectados em cada relação mássica mas analisados conjuntamente (10.000 eventos) por citometria de fluxo. 49

Figura 14. Eficiência de transfecção das células HeLa utilizando-se os complexos binários pDNA:protamina em diferentes relações mássicas (1:0,9; 1:2 e 1:5), além do lipoplexo pDNA:Lipofectamina. Os complexos foram preparados em tampão Hepes pH 6,5. Os valores apresentados representam a média de três poços transfectados em cada relação mássica (10.000 eventos) por citometria de fluxo. 51

Figura 15. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:lipofectamina em meio F-12, sem a presença de soro, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio. 53

Figura 16. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternario pDNA:protamina:lipofectamina em meio F-12 com 10% de Soro Fetal Bovino, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio. 54

Figura 17. Determinação da cinética de variação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:Lipofectamina em meio F-12 sem soro, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários, antes da adição de lipofectamina, foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio. 54

Figura 18. Determinação da cinética de variação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:Lipofectamina em meio F-12 com soro, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários, antes da adição de lipofectamina, foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do potencial Zeta relacionados à estabilidade (Ebatco™, 2015). 20

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 6,0. 37

Tabela 3. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 7,0. 37

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos DNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 8,0. 38

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 6,5. 40

Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 7,5. 40

Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 8,5. 41

Tabela 8. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 50 mM de NaCl.....43

Tabela 9. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl…43

Tabela 10. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 250 mM de NaCl...43

Tabela 11. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão fosfato de sódio em diferentes pHs. 45

Tabela 12. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão Hepes a diferentes pHs. 46

Tabela 13. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão Hepes contendo diferentes concentrações de NaCl.....47

Tabela 14. Diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta dos complexos pDNA:protamina com Lipofectamina, na presença de meio F-12 sem soro fetal bovino.....52

Tabela 15. Diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta dos complexos pDNA:protamina com Lipofectamina, na presença de meio F-12 com soro fetal bovino.....52

SUMÁRIO

1. Introdução 1
2. Revisão da Literatura 4
2.1. Terapia Gênica e Vacinas de DNA.....4
2.2. Entrega Gênica e Tráfego Intracelular de Vetores Não Virais.....8
2.3. Entrada na Célula.....9
2.4. Trafego Intracelular 10
2.5. Entrada no Núcleo.....11
2.6. Vetores Não Virais de Entrega Gênica.....11
2.6.1. Peptídeos e proteínas como vetores de entrega gênica 13
2.6.2. Lipossomas e lipídeos como vetores de entrega gênica.....14
2.7. Propriedades Físico-Químicas e Fatores que afetam a Eficiência de Vetores Não-virais 17
2.7.1. Sistemas coloidais e o potencial zeta.....17
2.7.2. Diâmetro hidrodinâmico médio.....21
2.7.3. Soluções Tampão 22
2.8.4. Força iônica.....24
3. Objetivo 26
4. Metodologia.....27
4.1. DNA Plasmidial (pDNA).....27
4.2. Formação do Complexo Binário pDNA:protamina.....27
4.3. Ensaio de Migração em Gel de Agarose 28
4.4. Determinação do Potencial Zeta dos Complexos Binários pDNA-Protamina.....29
4.5. Determinação do Potencial Zeta dos Complexos Ternários pDNA-Protamina-Lipofectamina 30
4.6. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico Médio dos Complexos Binários pDNA-Protamina 30
4.7. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico Médio dos Complexos Ternários pDNA-Protamina-Lipofectamina.....31
4.8. Cultivo, Transfecção e Análise das Células de Mamífero 32
4.9. Análise Estatística 34
5. Resultados e Discussão.....35
5.1. Purificação do DNA Plasmidial (pDNA).....35

5.2. Efeito do pH, Força Iônica e tipo do Tampão sobre as Características Físico-Químicas dos Complexos pDNA:protamina 36
5.2.1. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade em Tampão Fosfato 36
5.2.2. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade em Tampão Hepes 39
5.2.3. Potencial Zeta em Tampão Fosfato de Sódio 44
5.2.4. Potencial Zeta em Tampão Hepes 46
5.3. Ensaios de Transfecção em Células de Mamífero 48
5.4. Características Físico-Químicas dos Complexos Ternários pDNA:Protamina:Lipofectamina e Efeito da Presença de Soro 52
6. Conclusões 56
7. Sugestões para Próximos Trabalhos 60
8. Referencias Bibliográficas 61

1. Introdução

Os estudos de terapia gênica e vacinação por DNA estão em desenvolvimento desde a década de 1970, quando se vislumbrou pela primeira vez a possibilidade de substituir genes com o intuito de tratar doenças (Friedmann,1992). Dessa época até o ano de 2014, foram realizados aproximadamente 2.070 testes clínicos para tratamento das mais diversas doenças, sendo que a maior parte das doenças tratadas é relacionada ao câncer, seguido de doenças monogênicas e infecciosas, dentre outras.

Apesar do grande número de testes clínicos desenvolvidos até hoje e do grande potencial de aplicação vislumbrado para a terapia gênica, pouquíssimos produtos foram até hoje aprovados pelas agências reguladoras para comercialização, sendo os aprovados, em grande maioria, produtos de aplicação veterinária (Melchiorri et al., 2013). Em parte, esse atraso na viabilização de novos produtos deve-se aos receios quanto à segurança da utilização desses protocolos de manipulação e entrega de genes para pacientes humanos, embora um conhecimento cada vez mais amplo a respeito das técnicas envolvidas na criação de vetores, especialmente os virais, e dos mecanismos envolvidos na utilização desses esteja sendo acumulado no sentido de superar essas dificuldades. Por outro lado, no campo da eficiência desses protocolos, percebe-se com alguma clareza que muitas estratégias que se mostram altamente eficientes em estudos *in vitro* (cultivos celulares em placas, geralmente) falham em provar sua eficiência quando os testes são transferidos para os modelos *in vivo*, seja em modelos animais ou testes clínicos em humanos. Vários são os fatores que podem ser responsabilizados por esses

problemas, como a alta complexidade e número dos fluidos biológicos de organismos, diferença nos tipos celulares, respostas imunológicas, diferenças associadas à farmacocinética e *clearence* pelo organismo receptor, etc.

Em nosso grupo de pesquisa, desenvolvemos há sete anos vetores não-virais de entrega gênica baseados principalmente em proteínas, mas também em lipídeos. Tradicionalmente, nas pesquisas de entrega gênica com vetores não virais, cada novo vetor, na forma de complexos ou nanopartículas contendo DNA plasmidial, deve apresentar características físico-químicas bem definidas, como tamanho e carga superficial, de forma a enquadrar-se no que a literatura considera "adequado" para o processo de entrega gênica. Esses ensaios de caracterização são geralmente conduzidos com as amostras preparadas em soluções tampão e em condições de baixa concentração (em geral diluídas em água). Na maioria dos estudos, a cinética de formação dos complexos e a estabilidade são subavaliadas. Além disso, assume-se que as características físico-químicas (tamanho, carga, etc) dos complexos de entrega gênica obtidas nas condições dos ensaios serão suficientes como indicadores de que esses complexos são adequados para os testes *in vitro* e *in vivo,* realizados em diferentes condições. No entanto, nossa prática tem demonstrado que frequentemente não existe correlação clara entre essas características e os resultados de eficiência de transfecção *in vitro*, e menos ainda em relação aos ensaios *in vivo*. Infelizmente, no caso de proteínas, ou mesmo lipídeos e polímeros, utilizados como vetores de entrega gênica, não conseguimos encontrar na literatura estudos minimamente sistemáticos correlacionando a influência de fatores como o pH ou o tipo de tampão de complexação sobre as características físico-químicas finais dos complexos obtidos, assim como uma correlação destas com a eficiência de transfecção *in vitro*.

O estudo de mestrado aqui apresentado teve por motivação aumentar o conhecimento disponível na busca por respostas para essas questões. Até que ponto as condições de preparo, armazenamento ou aplicação de um complexo de entrega gênica podem alterar a carga, o tamanho e a polidispersidade desses complexos e, consequentemente, a eficiência de transfecção?

2. Revisão da Literatura

2.1. Terapia Gênica e Vacinas de DNA

A terapia gênica e a vacinação por DNA se baseiam na introdução no paciente de novas informações genéticas com o intuito de tratar doenças hereditárias ou adquiridas, ou ainda induzir uma resposta imunológica que leve a proteção contra agentes patogênicos, no caso das vacinas. Em ambos os casos, a escolha do vetor a ser utilizado na entrega do material genético é fator de importância fundamental (Hedgecoe, 2012).

Ainda na década de 1970, percebeu-se que o DNA “defeituoso” de doenças hereditárias poderia ser substituído por outra cópia de DNA sem o defeito, restabelecendo a função gênica inicialmente perdida (Friedmann,1992). Em 1990, foi aprovado o primeiro teste clínico utilizando a terapia gênica para o tratamento da Deficiência de Adenosina-Desaminase (ADA), uma doença hereditária que provoca imunodeficiência, tendo obtido sucesso no tratamento de uma criança de quatro anos (Hershfield, 2000). O fato da terapia gênica ter apresentado sucesso no tratamento da ADA, impulsionou as pesquisas na área pela busca de cura de doenças. Em 1999, estudou-se o tratamento da Ornitina Transcarbamilase (OTC), uma doença hepática hereditária na qual o metabolismo da amônia pelo fígado fica prejudicado, provocando um acúmulo de amônia no organismo. Neste caso específico, a terapia gênica não teve sucesso levando a morte um jovem de 18 anos. A morte do paciente levou a comunidade científica a repensar os estudos de terapia gênica, criando-se regulamentos de segurança mais rigorosos para os testes clínicos na área (Wilson, 2009).

Ao longo dos anos 2000, foram aprovados estudos para o tratamento de variadas doenças, incluindo SCID ligada ao Cromossomo X, ADA-SCID, Hemofilia B, Deficiência Lipoproteinlipase e Amaurose Congênita de Leber. Desde então, o número de testes clínicos em terapia gênica só vem crescendo (Wirth, Parker e Ylä-Herttuala, 2013). Até 2014, houve 2.076 testes clínicos para tratar as mais diversas doenças, sendo que a maior parte das doenças tratadas é relacionada ao câncer, seguido de doenças monogênicas e infecciosas, dentre outras, como mostra a Figura 1.

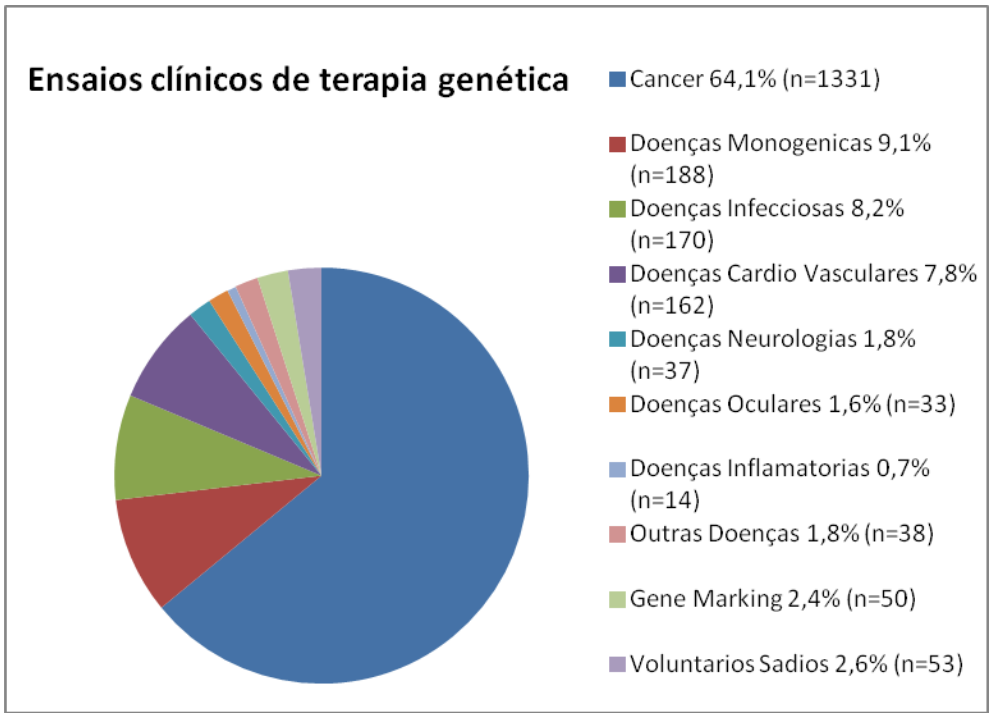

Figura 1. Testes clínicos para tratamento de doenças utilizando terapia gênica, registrada na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015).

A maior parte dos ensaios clínicos foi realizada na América do Norte, totalizando aproximadamente 65% dos ensaios clínicos, seguido da Europa com

25%, e pela Ásia com 4,7%. Mais da metade dos testes clínicos utilizando terapia gênica se concentra nos Estados Unidos com 63,2%, seguido pelo Reino Unido 9,9% e pela Alemanha com 4 %, conforme podemos ver na Figura 2.

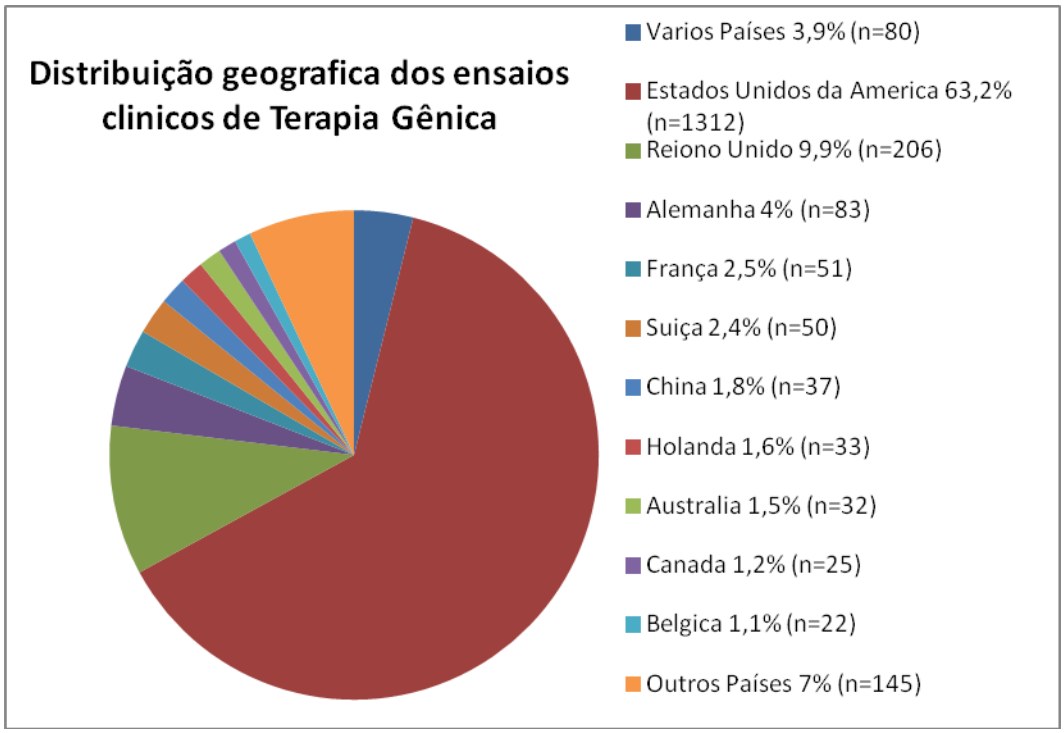

Figura 2. Testes clínicos para tratamento de doenças utilizando terapia gênica registrada na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015).

Os vetores de entrega gênica mais utilizados até o momento durante os estudos clínicos são o Adenovirus, com 22,3%, seguido pelos Retrovírus com 19,6%. Somados, os vetores não virais correspondem a aproximadamente 23% dos estudos realizados até 2014, conforme mostra a Figura 3.

No âmbito dos produtos comerciais, existem vacinas de DNA veterinárias aprovadas utilizando-se vetores plasmidiais, o que abre perspectivas para futura utilização em humanos. Dentre as vacinas de uso animal, temos a vacina gênica LifeTide®, aprovada para o uso veterinário em suínos (VGX Animal Health). Cada

dose de aplicação única é composta de 1,0 mL de DNA plasmidial contendo o gene que codifica para o hormônio de liberação de hormônio de crescimento (GHRH). O objetivo deste produto é diminuir a mortalidade de leitões, além de aumentar o número de leitões por porca. Outra vacina gênica para uso veterinário é a ONCEPT™ (Merial), sendo utilizada para tratamento de melanoma em cachorros (Pereira et al., 2014). Até o momento, o único produto comercial de terapia gênica aprovado no ocidente é o Glybera (UniQure), desenvolvido para tratar a deficiência genética que leva a ausência de lipase lipoproteína. O produto foi aprovado em 2013 pelo EMEA para comercialização na União Européia (Melchiorri et al., 2013). A maior limitação do Glybera, um vetor viral do tipo adeno-associado (AAV-1), é o alto custo do tratamento. Os valores estipulados recentemente na Alemanha são de 53000 euros por dose (vial). Como o tratamento envolve a aplicação de 21 doses por paciente, o custo total do tratamento é de aproximadamente 1,1 milhão de euros por paciente, o que pode tornar o seu uso proibitivo em muitos países (Ylä-Herttuala, 2015).

Portanto, ainda que produtos e muitos ensaios clínicos estejam sendo desenvolvidos, uma séria limitação que ainda existe para o sucesso da terapia gênica e das vacinas de DNA diz respeito às limitações referentes à entrega gênica do material genético às células de forma eficiente, segura e barata.

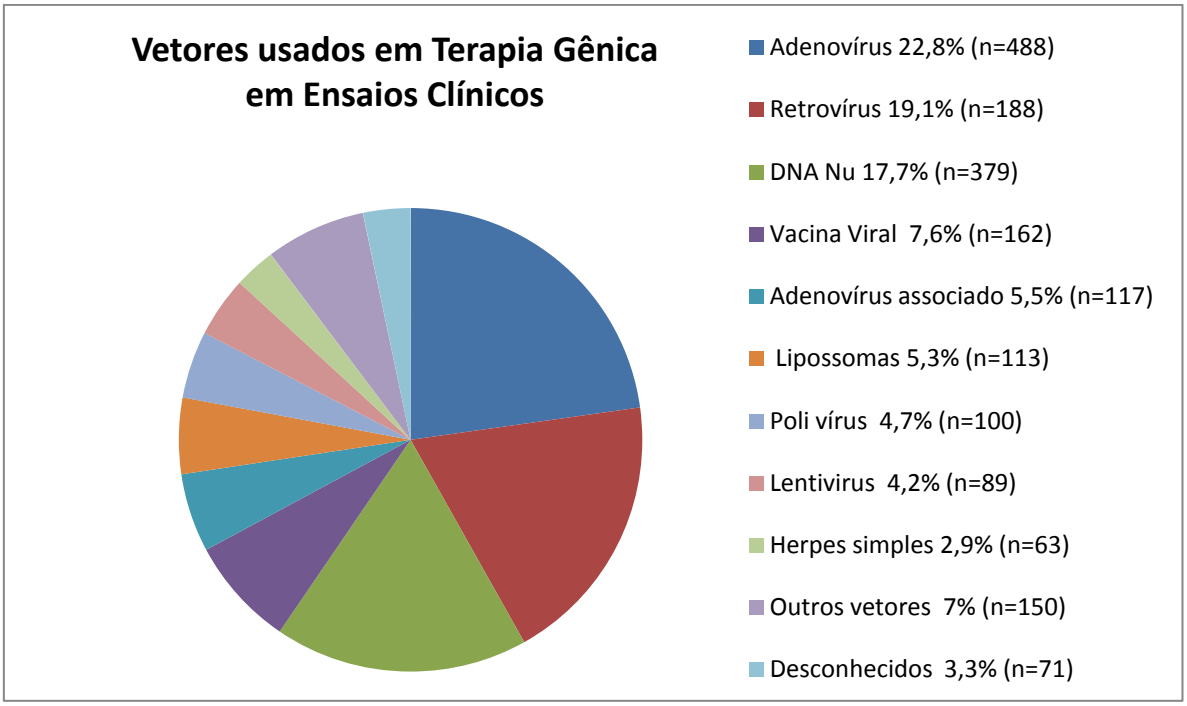

Figura 3. Vetores utilizados para transporte de material genético (DNA/RNA) em ensaios clínicos registrados na base de dados do periódico *The Journal of Gene Medicine*, Inglaterra (2015).

2.2. Entrega Gênica e Tráfego Intracelular de Vetores Não Virais

Vetores de entrega gênica são geralmente classificados como vetores virais e não virais. A escolha daquele a ser utilizado baseia-se, em geral, na natureza da doença a ser tratada e nas necessidades relativas ao tempo e intensidade da expressão do gene terapêutico a ser inserido (Audouy et al., 2002). Vetores virais são geralmente mais eficientes, pois suas características permitem o reconhecimento celular mediado por receptores específicos, internalização, transporte ao longo de microtúbulos e entrada no núcleo. Entretanto, vetores virais são difíceis e custosos de se produzir, além de estarem associados a respostas imunológicas e inflamatórias algumas vezes graves (Edelstein et al., 2007; Saccardo

et al., 2009). Mais seguros, os vetores não virais são geralmente menos eficientes no transporte do material genético, devido à elevada degradação por nucleases extra e intracelulares, dificuldade de internalização na célula e locomoção do pDNA no congestionado ambiente intracelular, além da dificuldade de superar a barreira representada pela membrana nuclear (Figura 4) (Rogers e Rush, 2012).

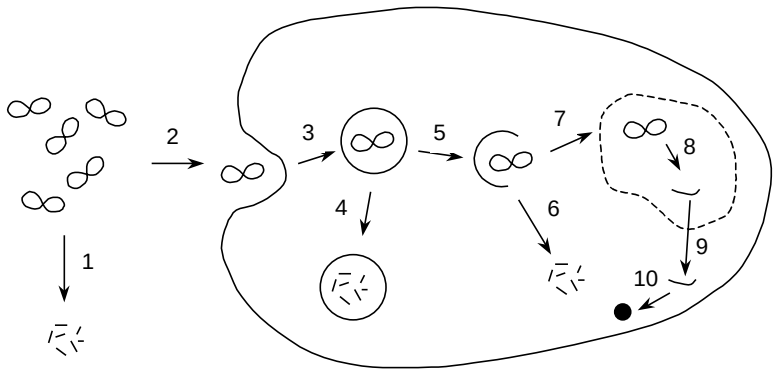

Figura 4. Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação do pDNA por nucleases extracelulares, (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação de pDNA no endossoma; (5) escape do endossoma; (6) degradação de pDNA por nucleases citosólicas; (7) entrada no núcleo; (8) transcrição; (9) exportação do mRNA; (10) tradução.

2.3. Entrada na Célula

Antes de entrar na célula, o vetor carregando o material genético terapêutico precisa atravessar barreiras físicas, enzimáticas e difusionais, como apresentados na Figura 4 (Nomani et al., 2014; Wang et al., 2012, Kuo e Wang ., 2014). A entrada geralmente envolve inicialmente o estabelecimento de interações eletrostáticas com

a membrana da célula, carregada negativamente. Essa é a principal limitação da entrega de material genético "nú", uma vez que ácidos nucléicos possuem naturalmente carga negativa, não interagindo com a membrana das células, o que dificulta sua internalização *via* endocitose (Wang et al., 2012).

Uma forma de facilitar as interações eletrostáticas é o uso de complexos que podem ser formados por polímeros, lipídeos, proteínas, entre outros (Nayerossadat et al., 2012). Em geral, a forma de entrada dos vetores não virais nas células ocorre por endocitose mediada pelos receptores clatrina ou caveolae, mas a macropinocitose, entre outras diferentes formas de interação, também ocorre. Por esse motivo, o tamanho e a carga da partícula contendo o DNA terapêutico são de importância fundamental, pois devem influenciar no tipo e eficiência da internalização (Ferrer-Miralles et al., 2008).

2.4. Trafego Intracelular

Logo após entrar na célula, o vetor contendo o DNA terá que resistir a degradação por endonucleases presentes no interior das vesículas endossomais. Escapar dessas vesículas é outra dificuldade frequentemente importante para a eficiência de entrega gênica, uma vez que a tendência natural é que o vetor aprisionado siga para a degradação em lisossomas. Quando consegue escapar, o DNA precisará ser transportado para a proximidade do núcleo, geralmente através da interação com proteínas motoras chamadas dineínas (Vázquez et al., 2008). As dineínas, proteínas multi-subunidades formadas por cadeias leves, pesadas e intermediárias, funcionam como motores levando cargas da periferia para a proximidade do núcleo (centrossoma) da célula (Favaro et al., 2014). Vetores virais

muitas vezes são capazes de interagir de forma específica com as dineínas, de forma a serem rapidamente transportados através do citoplasma da célula infectada. No caso de vetores não virais, isso geralmente ocorre de forma não específica, por exemplo, através da interação com proteínas nucleares presentes no citoplasma (Favaro et al., 2014).

2.5. Entrada no Núcleo

Moléculas maiores que 40kDa precisam ser transportadas ativamente para dentro do núcleo através de poros nucleares de 120 nm de diâmetro e 70 nm de profundidade formados por 30 diferentes proteínas, chamadas nucleoporinas. Esse processo acontece através do reconhecimento e ligação a proteínas importadoras, conhecidas como importinas, que possuem as sub-unidades α e β (Stewart, 2007). Esse reconhecimento acontece por ligação a uma sequência de reconhecimento específica presente na proteína a ser transportada, denominada sinal de localização nuclear (SLN). Uma vantagem de se complexar DNA às proteínas contendo SLNs, como é o caso da protamina, é o natural favorecimento da translocação nuclear do complexo (Favaro et al., 2014).

2.6. Vetores Não Virais de Entrega Gênica

A eficácia dos vetores depende da capacidade de transportar, proteger e de garantir a expressão do material genético de interesse nas células alvo. Os vetores não virais ideais devem possuir as principais características dos vetores virais, tais como capacidade condensação do DNA, reconhecimento celular, entrada na célula,

tráfego intracelular e translocação nuclear facilitados, além de não possuir as principais desvantagens dos vetores virais, como as reações inflamatórias e imunes (Conwell; Huang, 2005).

Ao falarmos dos vetores não virais, inferimos que estes, apesar de serem menos eficientes que os vetores virais, são mais seguros. Existem diversas classes de vetores não virais, tais como os lipossomas, lipídeos catiônicos (lipoplexos), polímeros policatiônicos (poliplexos), peptídeos sintéticos, proteínas, *virus like particles*, além de plasmídeo "nú" (Nayerossadat et al., 2012). Cada classe de vetores possui suas próprias vantagens e desvantagens.

Certos vetores não virais também podem ser descritos como "vírus artificiais" que podem se constituir de ligantes a receptores celulares para facilitar o reconhecimento celular e a entrada por endocitose. Os peptídeos fusogênicos servem para evitar a degradação nos endossomos e funcionam como sinais de localização nuclear (NLS) auxiliando os vetores não virais na entrada do núcleo (Khalil et al.,2006).

Os vetores não virais podem mimetizar os vetores virais através da formação de complexos que os ajudam a entrar na célula e a escapar dos endossomos e a se ligarem as proteínas transportadoras no citoplasma, as quais os transportam para o núcleo (Favaro et al., 2014). Estes vetores proteicos são constituídos por muitas cargas positivas (argininas e lisinas) que compactam o material genético. Essa mudança na carga do material genético com a formação dos complexos facilita a sua entrada na célula e a sua endocitose, mediada principalmente pelas clatrinas. Esse processo é facilitado no caso de vetores (partículas/complexos) com tamanhos menores que 200 nm (Rejman et al., 2004).

2.6.1. Peptídeos e proteínas como vetores de entrega gênica

Como comentado acima, nos últimos dez anos tem-se intensificado o estudo de peptídeos membrano-ativos, ricos em arginina e lisina, como facilitadores da entrega gênica (Ferrer-Miralles et al., 2008). Assim como em lipídeos e polímeros, a natureza catiônica destes peptídeos ou domínios proteicos permite a condensação e proteção do ácido nucleico (Favaro et al., 2014). Exemplos destes peptídeos são a polilisina, o TAT do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o peptídeo penetratina (ou antennapedia de Drosophila), e a protamina (Moschos et al., 2007; Toledo et al., 2012).

O TAT é um peptídeo de onze aminoácidos capaz de transportar moléculas através das membranas plasmática e nuclear (Nitin et al., 2009). Já a penetratina é um peptídeo anfifílico que possui diversos resíduos de arginina e lisina em sua cadeia, que interagem e condensam DNA, além de atuarem ativamente na transposição de membranas, facilitando assim a internalização na célula e também o escape de vesículas endossomais (Ferrer-Miralles et al., 2008).

Uma molécula também utilizada em estudos de entrega gênica é a pequena proteína protamina ou sulfato de protamina (Yuan et al., 2013). Essas moléculas possuem massa molecular entre 4000 – 4250 kDa (pI entre 12 e 13) e é caracterizada por possuir uma cadeia de aminoácidos rica em arginina, composta por aproximadamente 32 aminoácidos na sequência primária: PRO-ARG-ARG-ARG-ARG-SER-SER-SER-ARG-PRO-VAL-ARG-ARG-ARG-ARG-ARG-PRO-ARG-VAL-SER-ARG-ARG-ARG-ARG-ARG-ARG-GLY-GLY-ARG-ARG-ARG-ARG (Sorgi, Bhattacharya e Huang,1997). A protamina é geralmente purificada de esperma de peixes como o salmão, e sua principal função é interagir e compactar o DNA

genômico para que este possa ser entregue ao núcleo do óvulo (Tsuchiya et al., 2006). Devido à capacidade de compactação do material genético, a protamina forma com o DNA partículas pequenas (nanoescala), carregadas positivamente e capazes de evitar a degradação intra e extracelular por nucleases. Além disso, a protamina possui sinal de localização nuclear, o que pode favorecer a entrada do complexo no núcleo das células transfectadas (Reynolds et al., 2005). Finalmente, a protamina é utilizada na medicina como neutralizante de anticoagulantes como a heparina, utilizada em cirurgias cardíacas, ou seja, já possui aplicação farmacêutica (Levy et al.,1995).

2.6.2. Lipossomas e lipídeos como vetores de entrega gênica

De forma geral, os lipossomas são estruturas fosfolipídicas em forma de bicamada esférica cujo volume aquoso central encontra-se circundado por uma ou mais lamelas concêntricas, com diâmetros variando de dezenas de nanômetros a dez micrometros (Lasic, 1993). São semelhantes e possuem compatibilidade biológica e química com as membranas celulares, o que facilita sua utilização para a entrega de fármacos e material genético às células (Hayashi et al., 2013). O encapsulamento de drogas em lipossomas costuma levar à melhora na farmacocinética e na distribuição de agentes terapêuticos (Chang e Yeh, 2012).

Os lipossomas catiônicos, contendo geralmente grupamentos amina ou quaternários de amônio em sua estrutura, são capazes de interagir eletrostaticamente com o DNA (carregado negativamente), produzindo complexos compactos que reduzem a susceptibilidade à nucleases, favorecendo assim a transferência do material genético (El-Aneed, 2004). Esses lipossomas podem

conter apenas o lipídio catiônico ou ainda incorporarem lipídios neutros, como o Colesterol. Vale destacar a necessidade de lipídios estruturais (EPC, Fosfatidil Colina de Ovo) para a formação dos lipossomas, visto que apenas os lipídios catiônicos geralmente não induzem a formação dos lipossomas. Além disso, pensando no processo de liberação do material genético no citoplasma celular, é necessário que estes sejam liberados da membrana endossomal após a entrada por endocitose. Nesse sentido, é importante a presença de lipídios auxiliadores ("helpers"), também conhecidos como fosfatidiletanolamina (PEs) que intensificam o processo de liberação por possuírem propriedade fusogênicas, que facilitam a desestabilização da membrana endossomal (Felgner et al., 1994). Dentre essa classe de moléculas, podemos citar o DOPE (1,2 dioleoil-n-glicero-3-fosfato) como de grande utilidade nos estudos de transfecção *in vitro* de lipídios catiônicos (Nayerossadat et al., 2012).

No âmbito dos lipídeos, a Lipofectamina™ (Life Technologies) é um exemplo bastante usado de lipídeo catiônico que atua como vetor *in vitro,* complexando moléculas de ácido nucleico para que estas possam superar a repulsão eletrostática da membrana celular. A Lipofectamina™ (nome fantasia) é uma classe de compostos em que a carboxi espermina foi conjugada a lípidos através de uma ligação amida, formando o 2,3-di-oleil-oxi-N-[2(espermina-carboxamida)etil]-N,N-dimetil-l-propano-amina (DOSPA). A formulação final da Lipofectamina™ é composta por uma mistura 1:1 (em massa) entre o DOSPA e o DOPE (Patente US N° 5.334.761). A Figura 5 apresenta a estrutura desses dois compostos.

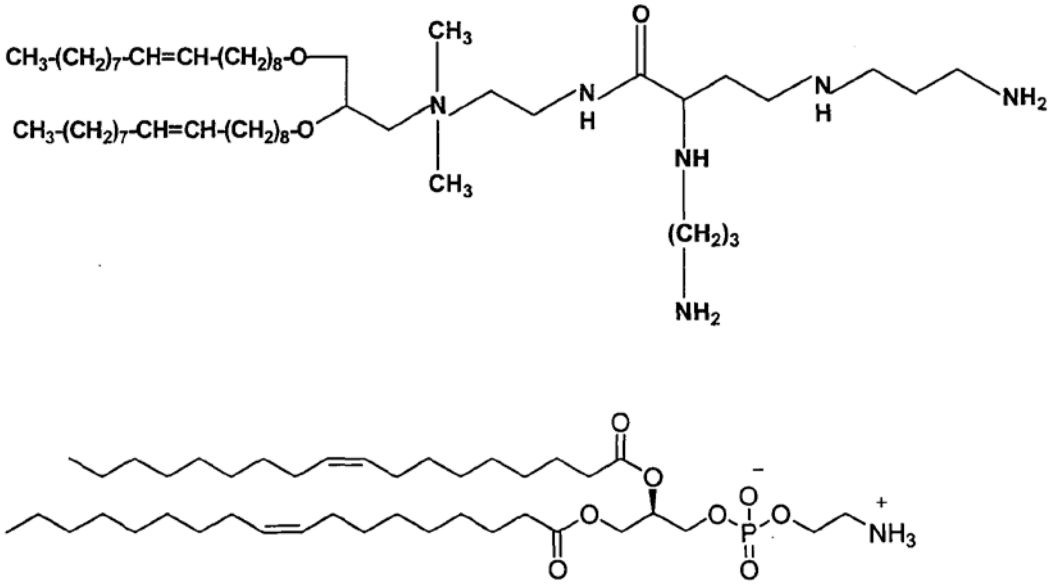

Figura 5. Estruturas moleculares dos lipídeos DOSPA (em cima) e DOPE (em baixo), utilizados na formulação do reagente de transfecção Lipofectamina™ (Life Technologies) (Patente US N° 5.334.761).

Apesar de aumentar a eficiência da entrega de pDNA, lipídeos catiônicos podem apresentar como desvantagem a super-estabilização do complexo, o que inibiria a liberação do DNA no interior da célula (Kataoka, 2009). Além disso, trabalhos reportam elevada citotoxicidade associada à a propriedade natural desses lipídeos de fusão com membranas (Vázquez et al., 2008). Em um estudo realizado por De La Torre et al. (2009), foi desenvolvido um lipossoma catiônico composto por EPC/DOPE/DOTAP para veiculação de uma vacina gênica contra tuberculose, sendo para isso incorporado o DNA plasmidial contendo o gene *hsp65* dentro da estrutura lipídicas. Os resultados mostraram que o lipossoma foi capaz de incorporar corretamente o DNA-hsp65. Além disso, as estruturas foram reprodutíveis, apresentado níveis de citotoxicidade próximos aos encontrados com a utilização do DNA nú. Em nosso grupo, esse mesmo lipossoma foi utilizado no encapsulamento de complexos binários formados por pDNA e proteínas (protamina ou T-Rp3) (Alves,

2013). Os estudos mostraram que a encapsulação do complexo binário aumentou a eficiência de transfecção *in vitro* de células HeLa. Contudo, o nível de citotoxicicidade também aumentou consideravelmente nos complexos pseudo-ternários quando comparados aos binários, o que pode inviabilizar uma possível utilização *in vivo*.

2.7. Propriedades Físico-Químicas e Fatores que afetam a Eficiência de Vetores Não-virais

2.7.1. Sistemas coloidais e o potencial zeta

Coloides são definidos como misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes em que pelo menos um dos componentes da mistura apresenta dimensão no intervalo de 1 a 1000 nanômetros. Alguns exemplos de sistemas coloidais são: sabonete, xampu, leite, café, manteiga, geleia, entre outros. Nesse sentido, pode-se dizer que suspensões contendo vetores virais ou não virais também são consideradas sistemas coloidais.

Quando as partículas de um coloide apresentam tamanhos diferentes, dizemos que são polidispersos. As diferentes interações entre as fases dispersas e a de dispersão são críticas na estabilidade dos coloides. Estas interações incluem a atração e repulsão eletrostática, as atrações de Van Der Waals, ligações de hidrogênio, etc (Van Beurten,1981).

Os sistemas coloidais pressupõem equilíbrios químicos nas fases. A estabilidade de uma suspensão coloidal combina a ação de movimentos Brownianos com a interação entre as partículas. O movimento Browniano é o movimento

aleatório das partículas resultante das colisões com as moléculas ao redor. Dependendo das interações entre as partículas e do tempo transcorrido, pode-se observar nas suspensões coloidais a agregação ou mesmo a precipitação de partículas.

A fim de compreender o movimento de partículas coloidais, adota-se por convenção o modelo da dupla camada. Ele diz que, em torno de uma partícula, contra-íons irão formar uma camada densa e firmemente empacotada, conhecida como camada de Stern. Afastando-se da superfície da partícula, a camada torna-se mais difusa, e serão encontrados íons da mesma carga da partícula, em um gradiente de concentração, de forma a equilibrar a carga como um todo. Essa segunda camada é conhecida como camada difusa. A variação do potencial elétrico com a distância da superfície da partícula pode ser vista na Figura 6. Nela, podemos ver a distinção entre a camada de Stern e a camada difusa.

O potencial zeta é aquele medido na fronteira entre a camada de Stern e a camada difusa. Como se considera que a camada de Stern está firmemente ligada à partícula, enquanto a camada difusa não, o valor do potencial zeta é uma medida da mobilidade da partícula coloidal. Além disso, o valor está relacionado à resistência da mesma à agregação. A maiores distâncias, a força repulsiva devido à carga supera a força atrativa de van der Waals, portanto partículas carregadas tendem a se repelir, enquanto aquelas com carga pequena tem maior tendência a agregar.

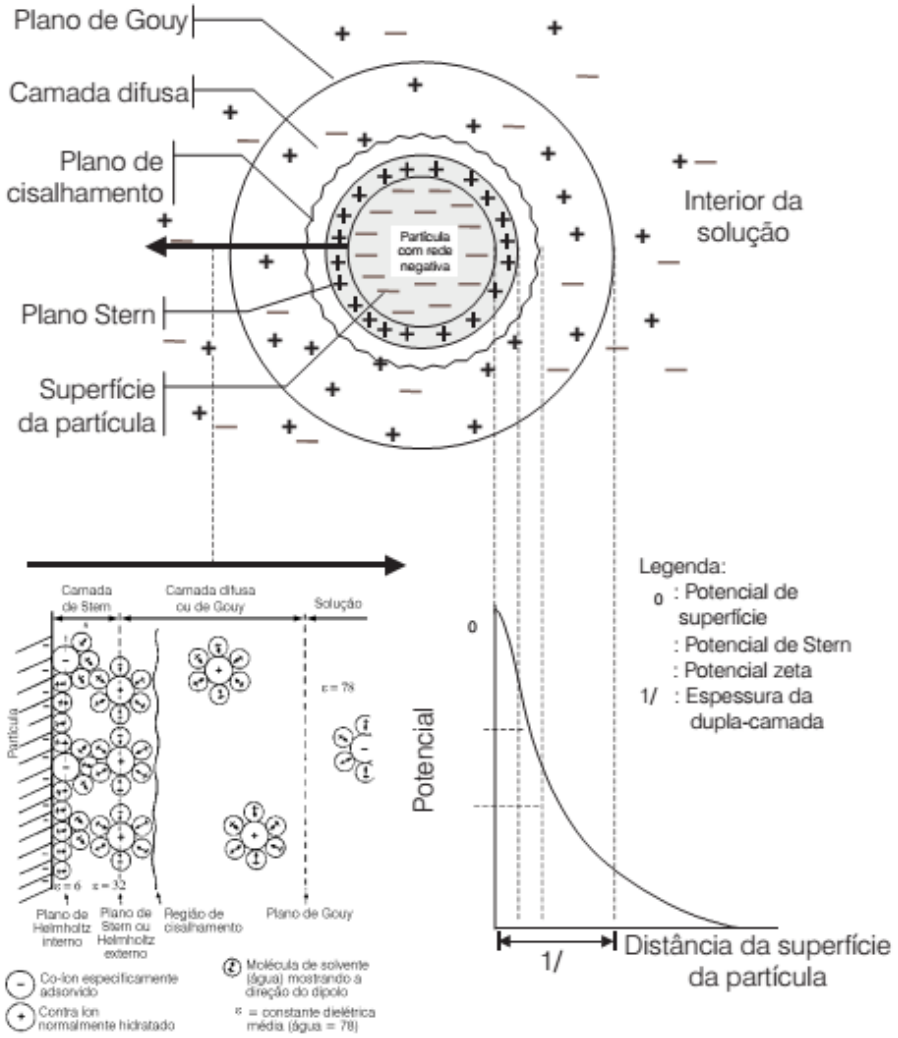

Figura 6. Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido. Retirado de Junior (1999).

A determinação do potencial zeta é feita aplicando-se dois campos eletromagnéticos com cargas opostas, sendo que as partículas com cargas contrárias se movimentam em direção a esses campos. Busca-se, na prática, determinar a mobilidade eletroforética da partícula, que é proporcional ao potencial zeta. Para o cálculo propriamente dito, é utilizada a equação de Henry, descrita abaixo:

$$U_E = \frac{2 \in \xi F(\kappa a)}{3\eta}$$

onde U_E é a mobilidade eletroforética da partícula, ζ é o potencial zeta, ε é a constante dielétrica do solvente, F(κa) é a função de Henry e η é a viscosidade (Kaszuba, 2010).

O valor do potencial zeta é um indicativo do grau de estabilidade de suspensões coloidais, como podemos ver na Tabela 1. Além disso, o potencial zeta de um vetor e a sua capacidade de transfecção costumam estar intimamente relacionados. Como a membrana celular possui carga negativa, é de se esperar que partículas com carga superficial positiva tenham melhor interação com a mesma, facilitando-se assim a entrada na célula. De fato, isto tem sido demonstrado na literatura. Zelphati e Szoka (1996) mostraram que a eficiência de transfecção é aumentada se feita por complexos de lipídeos catiônicos com DNA, carregados positivamente. Por sua vez, estudos feitos por Park et al. (2003) com fragmentos de proteína como vetores de DNA plasmidial também mostraram uma alta eficiência de transfecção gênica para vetores com potencial zeta superior a +20 mV.

Tabela 1. Valores do potencial Zeta relacionados à estabilidade (Ebatco™, 2015).

Valor do potencial zeta (mV)	Estabilidade da suspensão
±60 a ±100	Muito Estável
±30 a ±60	Estável
±10 a ±30	Instável
±0 a ±10	Muito Instável

2.7.2. Diâmetro hidrodinâmico médio

O tamanho, conforme mencionado anteriormente, tem influência direta na eficiência de transfecção celular. Em geral, quanto mais enovelado e compactado estiver o DNA, maior será sua capacidade de transpassar a membrana celular. Existem diversas maneiras de se determinar o tamanho de partículas. A mais utilizada e divulgada na literatura é o Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering - DLS). Essa técnica consiste na medição do movimento browniano de partículas pequenas através da medida de espalhamento de um feixe de luz incidente. O movimento browniano é decorrente de choques da partícula de interesse com as moléculas de solvente que a circundam. Quanto menor a partícula, maior será sua velocidade após essas colisões. Isso fará com que a intensidade da radiação espalhada por elas varie mais rapidamente. Se a partícula for grande, sua velocidade será menor e a variação da intensidade também será menor. A intensidade de espalhamento que uma partícula promove é proporcional ao diâmetro da mesma, elevado à sexta potência. Tal propriedade é um complicador para a medida de número de partículas por DLS, uma vez que se tivermos, por exemplo, duas partículas na amostra, uma com 10 nm e outra com 100 nm, a segunda apresentará um valor de intensidade 10^6 vezes maior que a da primeira, o que pode comprometer, até certo ponto, a medida (por “estouro de escala”, ou por picos reais serem percebidos como “ruídos", por exemplo).

De forma geral, o diâmetro hidrodinâmico das partículas é calculado através do valor do coeficiente de difusão translacional aplicado à equação de Stokes-Eistein, apresentada abaixo.

$$d(H) = \frac{(KT)}{(3\pi\eta D)}$$

onde: d(H) é o diâmetro hidrodinâmico; D é o coeficiente de difusão translacional; K é o coeficiente de Boltzmann ($1{,}38.10^{-23}$ J/K); T é a temperatura absoluta e η é viscosidade absoluta do solvente.

Importante também é notar que o diâmetro indicado pelo DLS não é o diâmetro real, mas sim o diâmetro de uma partícula que teria o mesmo movimento hidrodinâmico das partículas analisadas. Fatores que influenciam nessa medida são a estrutura externa à partícula, o tipo de íons presentes no meio e o fator de esfericidade da mesma, relacionado à sua forma.

Outras técnicas para medir o tamanho de partículas são medições manuais, de microscopia. Em geral, a literatura consultada indica que partículas entre 100 e 200 nm são as mais eficientes para a transfecção de células de mamífero cultivadas *in vitro* (Park et al., 2003).

2.7.3. Soluções Tampão

Soluções tampão são tradicionalmente utilizadas para diminuir a variação do pH de soluções ou suspensões quando estas são submetidas a adição de pequenos volumes de ácido ou base. Estas soluções são preparadas adicionando-se uma base fraca a um ácido forte ou uma base forte a um ácido fraco. A equação de Henderson-Hasselbalch, abaixo, é utilizada para se calcular o pH de uma solução tampão, a partir do pKa (a constante de dissociação do ácido) e de concentrações do equilíbrio ácido-base, do ácido ou base conjugada.

$$pH = pKa + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

Os organismos vivos e muitas de suas macromoléculas são suscetíveis a pequenas variações de carga e concentração de hidrogênio. Entretanto os seres vivos dependem de íons hidrogênio para muitas reações bioquímicas, sendo de fundamental importância à existência de tampões biológicos.

Muitos tampões, quando em contato com organismos vivos, possuem outras funções além da estabilização do pH. Um tampão ideal deve ter propriedades de estabilização do pH e não interagir com o organismo, devendo ainda ter as seguintes propriedades: solubilidade em água e em outros solventes; deve ser retido pela membrana biológica; deve ser pouco influenciado pelo efeito do sal; não deve reagir como análogo de qualquer reação bioquímica. Alguns tampões Zwitteriônicos costumam possuir as propriedades de um tampão ideal. O tampão Hepes é o mais bem sucedido, ajudando a preservar o transporte de elétrons, entretanto nenhum tampão é realmente inerte (Ferguson, 1979).

O tampão Hepes possui um caráter Zwiteriônico, sendo muito utilizado devido a sua constante de dissociação variar pouco com a temperatura, quando comparado a outros tampões. O seu pKa é de 7,5 e o seu pH de tamponamento varia entre 6,8 e 8,2. A característica Zwiteriônica do tampão Hepes se deve ao fato de ele possuir ao mesmo tempo uma carga negativa e uma carga positiva.

Outro tampão bastante utilizado em estudos celulares e bioquímicos, incluindo entrega gênica, é o tampão fosfato de sódio, muitas vezes na forma de tampão fosfato salino (PBS), especialmente no pH 7,4. O pKa do tampão fosfato é de 7,21 e o intervalo do tamponamento varia entre os pHs 5,8 a 8,0. Uma

característica desse tampão é o fato de possuir várias cargas negativas e ter a sua solubilidade afetada pela variação da temperatura (Schiel, 2005). Na Figura 7 podemos observar as estruturas químicas do tampão Hepes e do tampão fosfato.

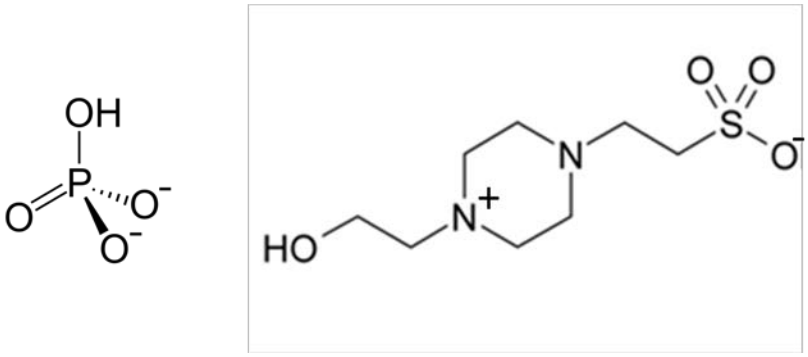

Figura 7. Estruturas químicas dos tampões fosfato (esquerda) e Hepes (direita), mostrando a quantidade e posição das respectivas cargas elétricas em pH neutro.

2.8.4. Força iônica

A força iônica é uma medida da concentração de cargas iônicas em uma solução (Buxton,1988). Essa concentração de eletrólitos dissolvidos pode afetar as propriedades de moléculas e complexos biológicos em solução, como o a carga superficial (potencial zeta), o tamanho e a solubilidade. A força iônica (I) é função da concentração de todos os íons presentes em uma solução, e pode ser calculada pela seguinte equação:

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i} C_i Z_i^2$$

onde C_j é a concentração molar do íon i (mol/L), e Z_j é o número de carga desse íon,

sendo que i é o indicativo de cada espécie de eletrólito presente na solução.

Como visto anteriormente, a concentração e o tipo de íon presente em uma solução pode afetar tanto o potencial zeta como o diâmetro hidrodinâmico de macromoléculas biológicas (e complexos de macromoléculas) em solução, além da solubilidade destas (Carneiro-da-Cunha et al., 2011).

De forma geral, a condensação de DNA plasmidial, por meio de peptídeos ou proteínas, de forma a criar partículas toroidais capazes de penetrar em células de mamífero requer uma sequência de aminoácidos positivos (lisinas ou, principalmente, argininas) de no mínimo 6 a 10 resíduos (Rudolph et al., 2003). Essa interação é, portanto, mediada por interações eletrostáticas, sendo fortemente dependente da força iônica do meio onde o complexo se encontra.

No entanto, no caso de proteínas ou mesmo lipídeos, utilizados como vetores de entrega gênica, não foram encontrados na literatura estudos sistemáticos correlacionando influência da força iônica, do pH ou do tipo de tampão de complexação sobre as características físico-químicas (tamanho, carga, morfologia) finais dos complexos obtidos, assim como uma correlação destas com a eficiência de transfecção *in vitro*.

3. Objetivo

O principal objetivo desse trabalho foi o de contribuir para um melhor conhecimento do efeito do pH, força iônica e tipo de tampão de complexação, sobre as características físico-químicas dos complexos de entrega gênica pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipofectamina formados, características essas que podem afetar a eficiência de transfecção de células de mamífero.

4. Metodologia

4.1. DNA Plasmidial (pDNA)

Para os ensaios de caracterização físico-química e para a transfecção de células *in vitro* (macrófagos e células Hela), foi utilizado o plasmídeo modelo pVAX1GFP (3697 pb) descrito em detalhes por Azzoni *et al.* (2007) (Figura 8). Trata-se de um plasmídeo feito para vacinas de DNA contendo: promotor do citomegalovírus humano (CMV), gene repórter da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP), gene de resistência à Kanamicina e origem de replicação procariota pMB1.

Para obtenção dos plasmídeos foram utilizadas as células de *E. coli* (DH5α) transformadas com o plasmídeo pVAX1GFP. Os crescimentos bacterianos foram realizados em frascos Erlenmayer de 2 L contendo 200 mL de meio LB (Luria-Bertani) e kanamicina (30 µg/mL) que ficaram sob agitação a 250 RPM e 37°C *overnight*. Posteriormente os plasmídeos foram purificadas através do Kit comercial ILLustra Plasmid Midi Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante.

4.2. Formação do Complexo Binário pDNA:protamina

Para a formação do complexo binário foi adicionado primeiramente 500 ng de pDNA (concentração 100 ng/µL), 4 µL de tampão Hepes (pH 6,5; 7,5 ou 8,5) ou fosfato (pHs 6, 7, ou 8), massas de protamina equivalentes as seguintes proporções de pDNA:protamina:1:0; 1:0,5; 1:0,7; 1:0,9; 1:1; 1:2; 1:5 e água (Milli-Q) completando 20 µL para uso no ensaio de migração em gel de agarose. Na determinação do diâmetro hidrodinâmico médio por DLS e na determinação do potencial zeta, os

complexos foi utilizado o dobro do volume, porém mantendo as concentrações.

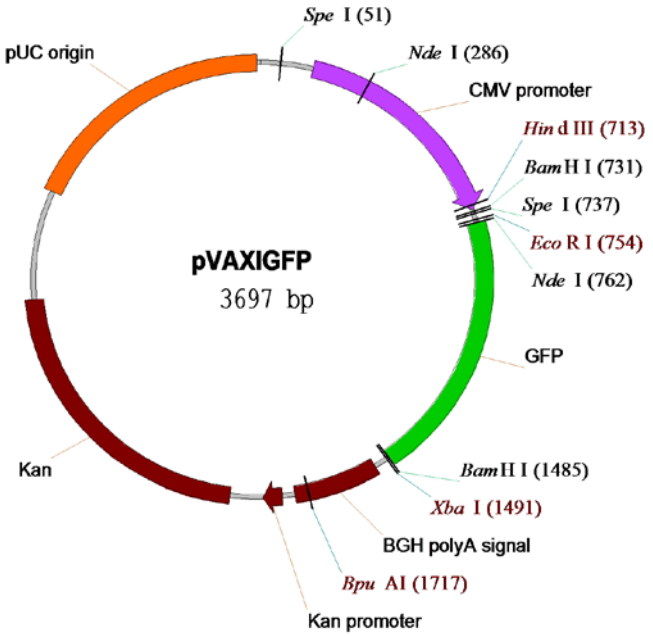

Figura 8. Mapa do plasmídeo pVAX1GFP descrito em detalhe por Azzoni *et al*. (2007). O plasmídeo foi desenvolvido originalmente com a denominação pVAX1 pela empresa Invitrogen para utilização em estudos de vacinação por DNA.

4.3. Ensaio de Migração em Gel de Agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose (0,8%) foi usada para a avaliação da integridade do DNA plasmidial purificado. As corridas foram realizadas em tampão TAE a voltagem constante de 60 V.

4.4. Determinação do Potencial Zeta dos Complexos Binários pDNA-Protamina

O potencial zeta é um forte indicador de estabilidade de partículas coloidais. Ele representa a carga elétrica (dada em volts) de uma partícula medida pela presença de contra íons (de cargas opostas) no filme em torno dessas partículas. Por ser uma medida da "carga superficial", o potencial zeta indica a possibilidade ou não de repulsão eletrostática entre as partículas igualmente carregadas adjacentes em uma solução ou suspensão. Sua determinação consiste na aplicação de um campo eletromagnético na solução contendo partículas em movimento browniano. As partículas tendem a migrar em direção ao eletrodo carregado com carga oposta. A velocidade é então medida por meio de um Anemômetro Doppler, através de mudanças ou desvios de frequência de um feixe laser causados pelo movimento das partículas. Essa mobilidade eletroforética está relacionada ao potencial zeta através da Equação de Henry (Lyklema, 2000), apresentada anteriormente.

Em nosso caso, para a determinação do potencial zeta, foi adicionado em tubos de 1,5 mL soluções binárias de pDNA e protamina nas relações mássicas de 1:0,5, 1:0,7, 1:0,9, 1:1, 1:2, 1:5 e completou-se o volume da solução para 40 µL com solução tampão (Fosfato ou Hepes 30 mM a diferentes pHs ou concentração de NaCl). Incubou-se as amostras por 10 minutos e adicionou-se 960 µL de água Milli-Q, procedendo-se a leitura no equipamento Zetasizer (Malvern). As determinações de potencial zeta foram todas realizadas em triplicata, sendo que em cada determinação foi preparada uma nova solução do complexo.

4.5. Determinação do Potencial Zeta dos Complexos Ternários pDNA-Protamina-Lipofectamina

O potencial zeta dos complexos pDNA-protamina-lipofectamina foi medido preparando-se, primeiramente uma "solução A" com a adição de 3,3 µL de solução de pDNA (1 µg), solução contendo protamina de forma a obtermos as relações mássicas desejadas de 1:0,9 ,1:2 , 1:5 de pDNA:protamina e, finalmente, tampão Hepes pH 6,5 de forma a atingir um volume final de 20 µL. Incubou-se a solução A por 10 minutos a temperatura ambiente e misturou-se essa uma solução a uma "solução B" contendo 18,5 µL de meio de cultura F-12 (Invitrogen, não complementado) e 1,5 µL de Lipofectamina (preparada 5 minutos antes). Incubou-se as amostras por 20 minutos e adicionou-se 960 µL de água Milli-Q, procedendo-se a leitura no equipamento Zetasizer (Malvern).

No caso da determinação do potencial zeta do complexo na presença de soro, após a incubação por 20 minutos das amostras (solução "A+B"), adicionou-se 4,4 µL de soro fetal bovino (Invitrogen). Esperou-se 5 minutos e posteriormente adicionou-se 960 µL de água Milli-Q, procedendo-se a leitura no equipamento Zetasizer (Malvern). As determinações do potencial zeta foram todas realizadas em triplicata, sendo que em cada determinação foi preparada uma nova solução do complexo.

4.6. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico Médio dos Complexos Binários pDNA-Protamina

O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (complexos) foi obtido utilizando-se o espalhamento de luz dinâmico. O equipamento utilizado foi o

Zetasizer ZS90 (Malvern), que utiliza laser Ne-He com medida do ângulo de espalhamento de 90°. O diâmetro médio é calculado pela flutuação da intensidade do espalhamento de luz em função do tempo devido ao movimento browniano. O movimento browniano é um movimento aleatório de partículas num fluido, tendo como consequência choques entre todas as moléculas ou átomos presentes no em solução/suspensão. Como consequência do movimento browniano, as partículas menores se difundem mais rapidamente e as maiores mais lentamente, e a taxa de luz espalhada varia com a velocidade de difusão (New,1990).

Para a determinação do diâmetro das partículas, foram preparados complexos contendo pDNA e protamina nas relações mássicas de: 1:0,5, 1:0,7, 1:0,9, 1:1, 1:2, 1:5 de forma idêntica ao já descrito para a determinação de potencial zeta. As determinações de diâmetro hidrodinâmico foram também realizadas em triplicata.

4.7. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico Médio dos Complexos Ternários pDNA-Protamina-Lipofectamina

O diâmetro hidrodinâmico médio dos complexos pDNA-protamina-lipofectamina foi medido preparando-se, primeiramente uma "solução A" com a adição de 3,3 µL de solução de pDNA (1 µg), solução contendo protamina de forma a obtermos as relações mássicas desejadas de 1:0,9 ,1:2 , 1:5 de pDNA:protamina e, finalmente, tampão Hepes pH 6,5 de forma a atingir um volume final de 20 µL. Incubou-se a solução A por 10 minutos a temperatura ambiente e misturou-se essa uma solução a uma "solução B" contendo 18,5 µL de meio de cultura F-12 (Invitrogen, não complementado) e 1,5 µL de Lipofectamina (preparada 5 minutos

antes). Incubou-se as amostras por 20 minutos e adicionou-se 960 µL de água Milli-Q, procedendo-se a leitura no equipamento Zetasizer (Malvern).

No caso da determinação do diâmetro dos complexos na presença de soro, após a incubação por 20 minutos das amostras (solução "A+B"), adicionou-se 4,4 µL de soro fetal bovino (Invitrogen). Esperou-se 5 minutos e posteriormente adicionou-se 960 µL de água Milli-Q, procedendo-se a leitura no equipamento Zetasizer (Malvern). As determinações do diâmetro hidrodinâmico médio foram todas realizadas em triplicata, sendo que em cada determinação foi preparada uma nova solução do complexo.

4.8. Cultivo, Transfecção e Análise das Células de Mamífero

As células Hela (“Human epitheloid carcinoma”) foram cultivadas em meio F-12 (Ham - nutrient mixture, Gibco, Inglaterra) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Inglaterra). As células cresceram em frascos de 25 cm^2 e incubadas em ambiente umidificado contendo 5% de CO_2 e a temperatura de 37°C. As células de macrófago IC21 foram crescidas em meio RPMI (1000 mL) suplementado com 2,38 g de Tampão Hepes (Sigma), 1,5 g de Bicarbonato de Sódio, 2,5 g de Glicose Anidra, 0,11 g de Piruvato de Sódio e 10% de Soro Fetal Bovino (100 ml).

Após crescerem, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de cultura de 24 poços (5×10^5 células por poço). Depois foram incubadas por 48 horas até atingir o nível de confluência de 70-80% e então transfectadas com as diferentes soluções contendo os complexos pDNA-protamina.

A transfecção com os complexos binários pDNA-protamina foi realizada preparando-se, primeiramente uma "solução A" com a adição de 3,3 µL de solução

de pDNA (1 µg), solução contendo protamina de forma a obtermos as relações mássicas desejadas de 1:0,9 ,1:2 , 1:5 de pDNA:protamina e, finalmente, tampão Hepes pH 6,5 de forma a atingir um volume final de 50 µL. Incubou-se a solução A por 10 minutos a temperatura ambiente e adicionou-se aos poços em triplicata.

Para as transfecções com os complexos ternários (pDNA-protamina-lipofectamina), preparou-se a solução A como descrito acima e misturou-se essa solução a uma "solução B" contendo 48,5 µL de meio de cultura F-12 (Invitrogen, não complementado) e 1,5 µL de Lipofectamina (preparada 5 minutos antes). Incubou-se as amostras por 20 minutos e adicionou-se aos poços.

Após 24 horas, as células contidas nas placas de 24 poços foram tratadas com tripsina (5 min a 37ºC) e centrifugadas a 200*g* durante 5 min. Os pellets de células foram então lavados com PBS e ressuspensos em 1 mL da mesma solução. As células foram então analisadas num FACscan Scalibur (Becton-Dickinson, EUA), que registrou a dispersão de luz para a frente (FSC), dispersão lateral (SSC), e fluorescência no verde (FL1). A partir destes dados, as células foram primeiramente isoladas dos detritos celulares por suas características FSC versus SSC, e a eficiência de transfecção foi determinada subtraindo-se as células que exibem background FL1 (células não transfectadas) da população total de células das amostras transfectadas. Portanto, neste trabalho, definimos "eficiência de transfecção" como a percentagem de células que expressam fluorescência verde acima do nível do limiar definido pela autofluorescência natural das células controle não transfectadas. Essa eficiência de transfecção, obtida através do nível de expressão da GFP, foi calculada utilizando-se o software CellQuest Pro (BectonDickinson, EUA) que acompanha o equipamento. Os ensaios utilizando o citômetro de fluxo foram realizados no laboratório do Departamento de Análises

Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Bloco 17), coordenado pelo Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida.

4.9. Análise Estatística

Para a quantificação da dispersão dos dados experimentais obtidos neste trabalho, foram calculados os valores médios o os desvios padrão das amostras, calculados através do programa Microsoft Excel. A formula utilizada foi aquela apresentada abaixo, onde n é o número de amostras (valores), x_i é o valor de cada medida e x barra é o valor da média.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

5. Resultados e Discussão

5.1. Purificação do DNA Plasmidial (pDNA)

A purificação de DNA plasmidial em quantidade e qualidade adequados para os ensaios de caracterização físico-química e transfecção de células de mamífero foi feita utilizando-se o Kit GE Healthcare ILLustra PlasmidMidi Spin Kit. A pureza e integridade do pDNA foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose (0,8%). Foi utilizado o equipamento NanoDrop (ThermoScientific) para a determinação de concentração (A260nm), registrando-se valores de concentração próximos de 300 ng/µL, na relação de absorbância de A260nm/A280nm igual ou superior a 1,9, o que indica elevado grau de pureza. A Figura 9 apresenta uma típica eletroforese do DNA plasmidial pVAX1GFP purificado.

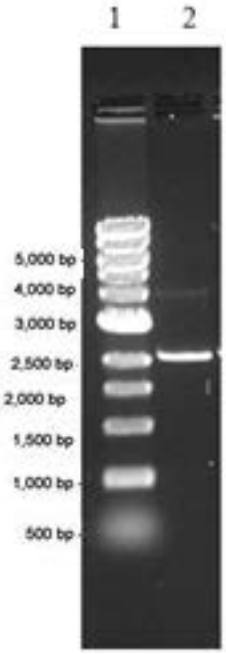

Figura 9. Análise qualitativa da purificação do pDNA em gel de agarose (0,8%). Legenda: 1) Marcador de massa molecular (1 kb); 2) plasmídeo modelo pVAX1GFP.

Convém salientar que a padronização do método de purificação (em quantidades de miligrama por protocolo) e a garantia de elevado grau de pureza do pDNA são fundamentais para os estudos aqui realizados, uma vez que a presença de impurezas tende a afetar fortemente a eficiência de transfecção de células por pDNA (La Vega et al., 2013).

5.2. Efeito do pH, Força Iônica e tipo do Tampão sobre as Características Físico-Químicas dos Complexos pDNA:protamina

5.2.1. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade em Tampão Fosfato

O pDNA nú possui caráter negativo quando em solução, sendo de se esperar que a pequena proteína catiônica protamina interaja e condense o pDNA, formando uma partícula toroidal, o que pode facilitar de diversas maneiras o trafego intracelular. Contudo, não está claro na literatura até que ponto o ambiente no qual é formada a partícula pode influenciar nas características físico-químicas da partícula, que são fundamentais para a transfecção, como o tamanho (diâmetro) a polidispersidade e a carga superficial (potencial zeta). Em nosso estudo, partículas formadas em tampão fosfato de sódio a pH 6,0, 7,0 e 8,0 foram avaliadas em termos dessas características.

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam o diâmetro hidrodinâmico médio (em número de partículas) e a polidispersidade destas quando formadas em diferentes pHs. O valor de polidispersidade mostra o quão homogêneas ou heterogêneas estão as partículas em suspensão. Quanto menor o valor, mais homogênia é a suspensão. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada relação pDNA:protamina e pH, sendo então calculados as médias e os desvios padrão nos diferentes pHs.

Conforme podemos observar pela Tabela 2 existe uma tendência de crescimento do tamanho da partícula com o aumento da relação mássica de protamina. Em pH 6,0, quase todos os valores de polidispersidade ficaram abaixo de 0,5, o que indica suspensões de razoável homogeneidade.

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 6,0.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	169 ± 35	0,35 ± 0,03
1:0,7	173 ± 39	0,38 ± 0,12
1:0,9	151 ± 17	0,28 ±0,03
1:1	334 ± 177	0,61 ±0,18
1:2	401 ± 72	0,49 ± 0,09
1:5	481 ± 108	0,40 ± 0,07

Em pH 7,0 observamos aumento da polidispersidade e tamanho das partículas em relação ao pH 6,0, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 7,0.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	207 ± 45	0,33 ± 0,02
1:0,7	430 ± 70	0,51 ± 0,10
1:0,9	407 ± 164	0,52 ± 0,12
1:1	564 ± 100	0,75 ± 0,17
1:2	588 ±122	0,81 ± 0,16
1:5	540 ± 84	0,65 ± 0,15

Finalmente, em pH 8,0 podemos observar a mesma tendência ao aumento do tamanho das partículas com um valor alto de polidispersidade, ocasionado pelo aumento do pH (Tabela 4).

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos DNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão fosfato pH 8,0.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	246 ± 73	0,53 ± 0,16
1:0,7	424 ± 150	0,65 ± 0,24
1:0,9	587 ± 87	0,75 ± 0,17
1:1	472 ± 140	0,83 ± 0,16
1:2	627 ±119	0,82 ± 0,14
1:5	595 ± 96	0,73 ± 0,16

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, foi construído o gráfico da Figura 10, em que é possível comparar os tamanhos das partículas em diferentes pHs e relações mássicas pDNA:protamina. Pode-se, portanto, observar uma tendência de aumento do tamanho das partículas conforme o pH aumenta. Uma explicação para esse fenômeno está provavelmente na variação da carga líquida da protamina, que envolve e condensa o pDNA, com o pH. Maiores valores de pH tendem a diminuir a carga líquida de proteínas devido a desprotonação de grupamentos amina ou imidazol, o que leva consequentemente a diminuição da carga superficial da partícula. Valores de carga superficial mais baixos tendem a levar partículas coloidais a agregação, o que explicaria o maior tamanho, maior polidispersidade e menor estabilidade. Por outro lado, o aumento do tamanho da partícula com o aumento da relação mássica parece ter explicação na própria presença de um maior número de moléculas de protamina por molécula de pDNA, o que por si só tenderia a aumentar o tamanho da partícula.

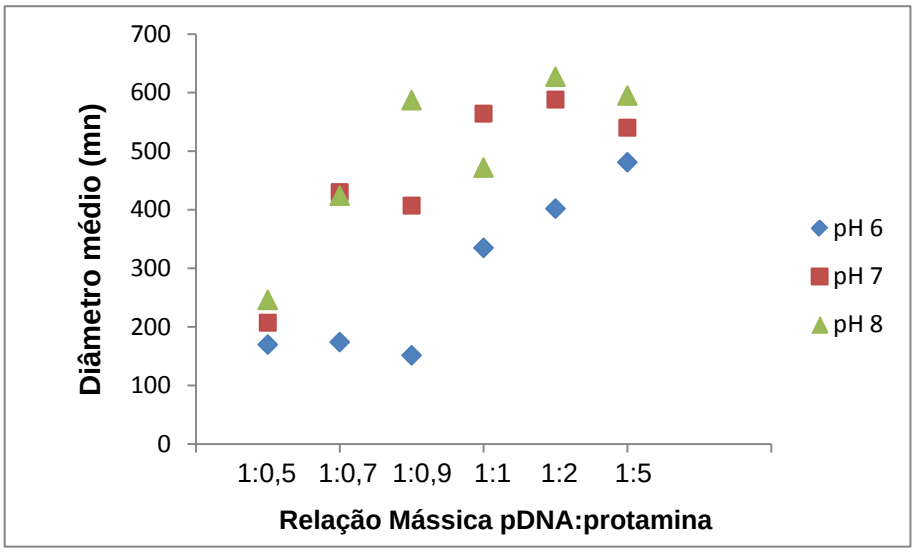

Figura 10. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes pHs em tampão fosfato de sódio. O diâmetro é reportado em número.

5.2.2. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade em Tampão Hepes

Foram também realizadas medições de tamanho de partículas formadas em tampão Hepes nos pH 6,5, 7,5 e 8,5 nas mesmas relações mássicas utilizadas para o tampão fosfato de sódio. As medidas foram realizadas em triplicata para cada relação pDNA:protamina. Importante ressaltar que os ensaios de formação do complexo binário em tampão Hepes foram realizados em conjunto com a aluna de Iniciação Científica Stella Ottengy, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP. Na Tabela 5 encontram-se os resultados desse estudo em tampão Hepes pH 6,5. Assim como em tampão fosfato pH 6,0, as partículas formadas em tampão Hepes a pH 6,5 apresentam diâmetro pequeno e baixa polidispersidade. No entanto, observa-se que essa característica é mais evidente em tampão Hepes do que em fosfato.

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 6,5.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	131 ± 20	0,29
1:0,7	131 ± 14	0,27
1:0,9	119 ± 29	0,35
1:1	134 ± 24	0,28
1:2	144 ± 17	0,32
1:5	407 ± 64	0,43

A Tabela 6 apresenta os dados obtidos no estudo à pH 7,5. Como ocorreu com o tampão fosfato, observa-se que as partículas obtidas nesse pH em tampão Hepes são maiores do que as obtidas em pH 6,5, além de possuírem maior polidispersidade.

Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 7,5.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	145 ± 47	0,35
1:0,7	129 ± 66	0,36
1:0,9	300 ± 145	0,53
1:1	289 ± 117	0,55
1:2	464 ± 108	0,50
1:5	554 ± 101	0,68

Por fim, a Tabela 7 apresenta os resultados para o pH 8,5. Percebe-se novamente que, ao aumentar o pH, obtém-se partículas maiores com desvios também maiores em relação à média, e maiores valores de polidispersidade.

Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados com diferentes relações mássicas em tampão Hepes pH 8,5.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	400 ± 90	0,51
1:0,7	370 ± 87	0,35
1:0,9	473 ± 147	0,62
1:1	725 ± 121	0,54
1:2	622 ± 23	0,47
1:5	618 ± 146	0,55

A partir dos dados apresentados nas tabelas 5, 6 e 7 foi possível construir o gráfico da Figura 11, em que é possível comparar os tamanhos das partículas obtidas em diferentes pHs.

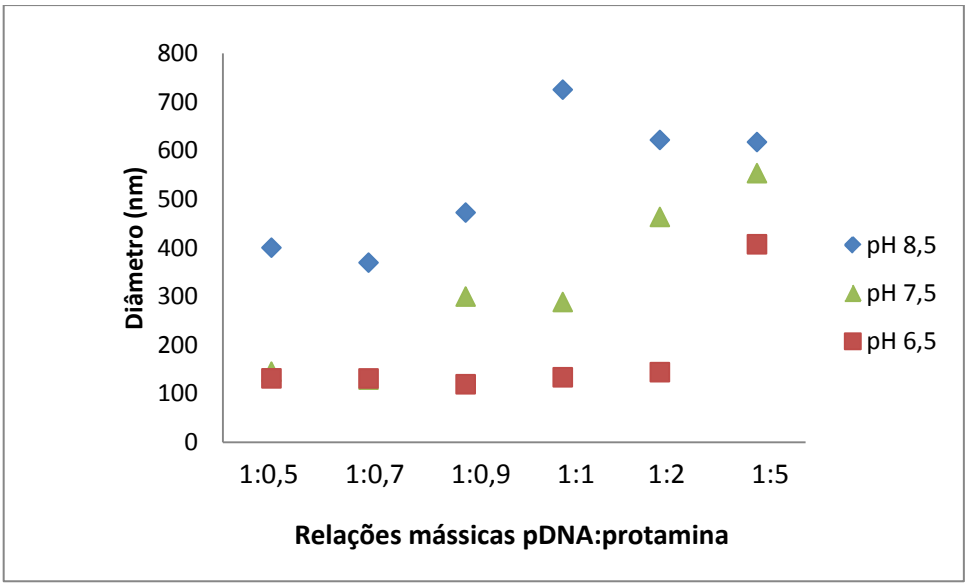

Figura 11. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes pHs em tampão Hepes. O diâmetro é reportado em número.

Uma comparação entre as Figuras 10 e 11 permite concluir que o efeito de variação (aumento) do tamanho das partículas com o aumento do pH é ainda mais evidente em tampão Hepes do que em fosfato. A complexação em tampão fosfato

tende a gerar partículas maiores e menos homogêneas, provavelmente por um efeito de "ponte salina" dos grupos fosfato do tampão, que possuem duas cargas negativas livres (Figura 7, Revisão da Literatura) para intermediarem a agregação de partículas carregadas positivamente, como é o caso das partículas contendo protamina em altas relações mássicas. Já o tampão Hepes, por seu carácter "zwitteriônico", com carga positiva e negativa na mesma molécula, acaba possivelmente mantendo o caráter repulsivo de cargas entre as partículas independentemente da relação mássica pDNA:proteína usada. O resultado seria uma maior estabilidade das partículas em solução, menor tamanho e polidispersidade. Por fim, nossos resultados estão em acordo com o estudo de Carneiro-da-Cunha e colaboradores (2011), que mostrou que o aumento do pH na faixa estudada por nós tende a provocar um efeito de aumento do tamanho de partículas formadas por diferentes polissacarídeos.

Utilizando o tampão Hepes em pH 7,5, avaliamos o efeito da força iônica sobre o tamanho e polidispersidade de partículas pDNA:protamina através da variação da concentração de NaCl no tampão (50 mM, 100 mM e 250 mM). Na Tabela 8 é possível ver que os complexos formados na presença de NaCl a 50 mM possuem tamanho e polidispersidade ligeiramente maiores do que os produzidos anteriormente sem adição de sal em mesmo pH. O aumento da concentração de NaCl, mais uma vez gerou partículas maiores e soluções com maior polidispersidade, cujos valores são mostrados nas Tabelas 9 e 10. De forma a facilitar a comparação, os dados de diâmetro foram utilizados para construir o gráfico da Figura 12 onde, para a maioria das relações mássicas, é possível perceber que com aumento da força iônica há a formação de complexos de maior diâmetro.

Tabela 8. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 50 mM de NaCl.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	346 ± 62	0,84
1:0,7	313 ± 73	0,68
1:0,9	321 ± 34	0,54
1:1	317 ± 44	0,71
1:2	530 ± 65	0,93
1:5	536 ± 54	0,94

Tabela 9. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	479 ± 64	0,60
1:0,7	436 ± 57	0,40
1:0,9	526 ± 82	0,37
1:1	453 ± 51	0,43
1:2	543 ± 45	0,97
1:5	522 ± 192	0,72

Tabela 10. Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade dos complexos pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 7,5 contendo 250 mM de NaCl.

Relação Mássica	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:0,5	426 ± 67	0,42
1:0,7	472 ± 50	0,46
1:0,9	592 ± 32	0,38
1:1	494 ± 93	0,43
1:2	580 ± 73	0,95
1:5	559 ± 60	0,96

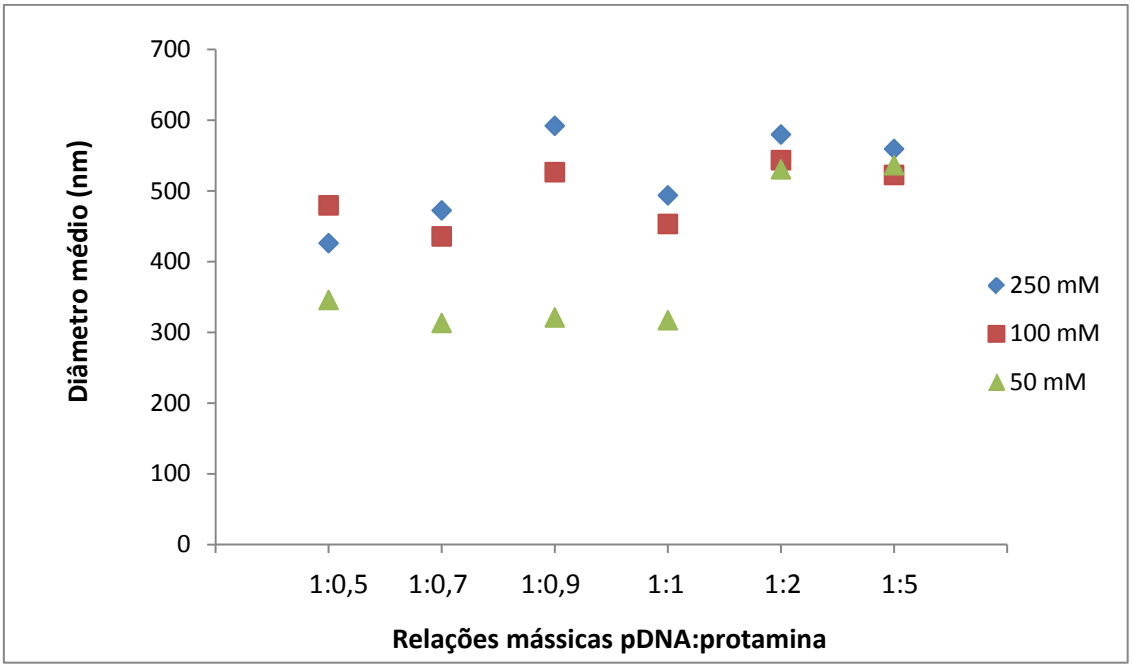

Figura 12. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo binário pDNA:protamina em várias relações mássicas e em diferentes concentrações de NaCl (50 mM, 100 mM e 250 mM) em tampão Hepes pH 7,5. O diâmetro é reportado em número. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Uma explicação para o fenômeno seria o efeito de "blindagem" proporcionado pela presença dos íons Na^+ e Cl^-, levando a uma diminuição do efeito de interação entre pDNA e protamina e, consequente, menor efeito de condensação do pDNA pela proteína.

5.2.3. Potencial Zeta em Tampão Fosfato de Sódio

A estabilidade de sistemas particulados como os que estudamos pode estar relacionada à carga das partículas em suspensão. A carga de partículas em suspensão possui uma relação direta com o potencial zeta dessas partículas. O potencial zeta pode ser definido como o potencial elétrico que existe no plano hidrodinâmico de cisalhamento que envolve partículas carregadas e é

essencialmente o potencial em um ponto no espaço onde íons de baixa massa molecular deixam de se mover com a partícula (movimento browniano) e se mantém junto ao solvente que envolve essa partícula. Na prática, valores elevados de potencial zeta, independentemente se positivos ou negativos, tendem a favorecer a estabilidade devido à força de repulsão entre as partículas.

Usando os mesmo tampões, pHs e forças iônicas descritos anteriormente, determinamos os potenciais zeta de partículas pDNA:protamina em várias relações mássicas. A Tabela 11 apresenta os valores de potencial zeta de partículas preparadas em tampão fosfato de sódio em diferentes pHs. Devido à alta polidispersidade desse sistema, principalmente nos valores de pH mais elevados (7 e 8), os erros de medida encontrados foram elevados, dificultando conclusões precisas. No entanto, os resultados sugerem que os valores, em módulo, de potencial zeta diminuem com o aumento do pH, em especial em pH 8,0. Isso pode explicar a elevada polidispersidade nessas condições, resultado da agregação. Finalmente, em um dado valor de pH, o aumento do número de moléculas de protamina por molécula de DNA leva a um aumento do potencial zeta do complexo.

Tabela 11. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão fosfato de sódio em diferentes pHs.

Relação mássica	**Potencial Zeta**		
	pH 6,0	**pH 7,0**	**pH 8,0**
1:0,5	-30 ± 4,1	-25 ± 6,5	-14 ± 11
1:0,7	-5,7 ± 11	5,8 ± 1,2	14 ± 1,0
1:0,9	-9,3 ± 2,8	8,4 ± 5,0	13 ± 2,0
1:1	9,6 ± 2,5	14 ± 2,0	6,1 ± 2,2
1:2	9,7 ± 2,0	16 ± 1,0	8,3 ± 6,8
1:5	11 ± 2,8	19 ± 0,9	7,0 ± 7,4

5.2.4. Potencial Zeta em Tampão Hepes

Como anteriormente, o potencial zeta das partículas em diferentes relações mássicas pDNA:protamina foi determinado também em tampão Hepes, nos pHs 6,5, 7,5 e 8,5 (Tabela 12). Os resultados indicam que os valores de potencial zeta diminuem com o aumento do pH, ou seja, em toda a gama de relações mássicas estudas, as partículas tendem a apresentar valores de potencial zeta maiores ("mais positivos") em pHs mais baixos. Ainda que algum efeito pode estar relacionado a maior presença de íons prótons H+ junto à partícula pDNA:protamina conforme o pH abaixa, aumentando consequentemente o valor de potencial zeta, não pode ser descartado um efeito do tampão, relativo ao protonamento/desprotonamento do grupo amina da molécula do Hepes. Vale ressaltar que o uso do tampão Hepes proporcionou em geral menores variações nas medidas de zeta, em relação ao tampão fosfato.

Tabela 12. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão Hepes a diferentes pHs.

	Potencial Zeta		
Relação mássica	**pH 6,5**	**pH 7,5**	**pH 8,5**
1:0,5	-16 ± 2,5	-27 ± 3,4	-27 ± 2,8
1:0,7	-20 ± 3,2	-29 ± 2,3	-27 ± 3,5
1:0,9	-18 ± 2,1	-28 ± 4,0	-20 ± 9,2
1:1	13 ± 2,2	13 ± 2,4	-18 ± 5,9
1:2	12 ± 2,0	12 ± 2,1	12 ± 3,4
1:5	20 ± 1,3	15 ± 2,0	14 ± 1,9

Por fim, estudamos o efeito da variação da força iônica do meio (em termos de concentração de NaCl) sobre o potencial zeta das partículas, utilizando-se o tampão Hepes pH 7,5 (Tabela 13).

Tabela 13. Valores de potencial zeta para os complexos pDNA:protamina em tampão Hepes pH 7,5 contendo diferentes concentrações de NaCl.

	Potencial Zeta		
Relação mássica	**50 mM**	**100 mM**	**250 mM**
1:0,5	-14 ± 4,1	-21 ± 5,8	-35 ± 6,0
1:0,7	-16 ± 4,9	-25 ± 4,1	-33 ± 4,5
1:0,9	-20 ± 6,6	-27 ± 3,7	-43 ± 3,1
1:1	-16 ± 8,5	-21 ± 3,9	-29 ± 4,9
1:2	12 ± 1,4	11 ± 2,4	17 ± 2,3
1:5	14 ± 2,3	16 ± 2,8	22 ± 1,5

Apesar dos erros de medida relativamente altos, provavelmente devido ao efeito da força iônica elevada nas amostras, pode-se observar que o valor do potencial zeta, em módulo, tende a aumentar com o aumento da concentração de NaCl. Esse resultado está em acordo com a teoria por trás da definição de potencial zeta, uma vez que o aumento da concentração de íons disponíveis nas camadas que circundam a partícula levam ao aumento da diferença de potencial elétrico detectado. Esse efeito positivo da concentração de NaCl sobre o potencial zeta também foi verificado por Carneiro-da-cunha e colaboradores (2011) para quatro entre os cinco polissacarídeos estudados. É importante ressaltar que o efeito de pH, força iônica e tipo de tampão sobre o potencial zeta de partículas biológicas tão complexas quanto essas (pDNA:protamina) é difícil de ser avaliado com precisão. Stoll (2013) descreve, como exemplo, que o aumento da concentração de sal pode ter efeitos antagônicos sobre o potencial zeta de nanoparticulas formadas por latex (negativo) e poliacrilamida ramificada (positiva), em estudos de floculação. Efeitos de neutralização de cargas intra-partícula e inter-partículas em conjunto com a atuação de outras forças, como Van der Waals, podem levar as partículas a assumir valores

de potencial zeta menores, tanto para concentrações de sal muito baixas, como para muito altas.

5.3. Ensaios de Transfecção em Células de Mamífero

Foram realizados ensaios de transfecção dos complexos pDNA:protamina em células de macrófagos e HeLa, buscando-se correlacionar os parâmetros físico-químicos obtidos nos estudos anteriores com a eficiência de entrega gênica *in vitro*. O pDNA utilizado foi o mesmo plasmídeo pVAX1GFP de forma que a eficiência de transfecção pode ser descrita como a porcentagem de células expressando a proteína verde fluorescente quantificada através de citometria de fluxo. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para a transfecção de células de macrófagos IC21 com complexos formados em tampão Hepes a pH 6,5 e pH 8,5, nas relações mássicas de 1:0,9, 1:2 e 1:5 (pDNA:protamina). A escolha dessas condições e relações mássicas teve por base os diferentes tamanhos e potencial zeta apresentados para essas partículas (Tabelas 5 e 12). A relação mássica 1:0,9 proporcionou partículas menores e carregadas negativamente, enquanto a relação mássica 1:2 levou a formação a formação de partículas pequenas e positivas. Já a relação mássica 1:5 proporcionou partículas maiores e positivas. Apesar de o nível de transfecção ter sido baixo, os resultados indicaram que partículas maiores e carregadas positivamente (relação 1:5) foram mais eficientes para a transfecção de macrófagos. Os ensaios de transfecção de células de macrófagos também foram realizados utilizando-se o pH 8,5, com resultados semelhantes aos encontrados em pH 6,5. Além dos complexos pDNA:protamina, também foi utilizado para a entrega do plasmídeo o reagente de transfecção Lipofectamina (Invitrogen). Os resultados

obtidos foram novamente baixos, indicando baixa eficiência de transfecção.

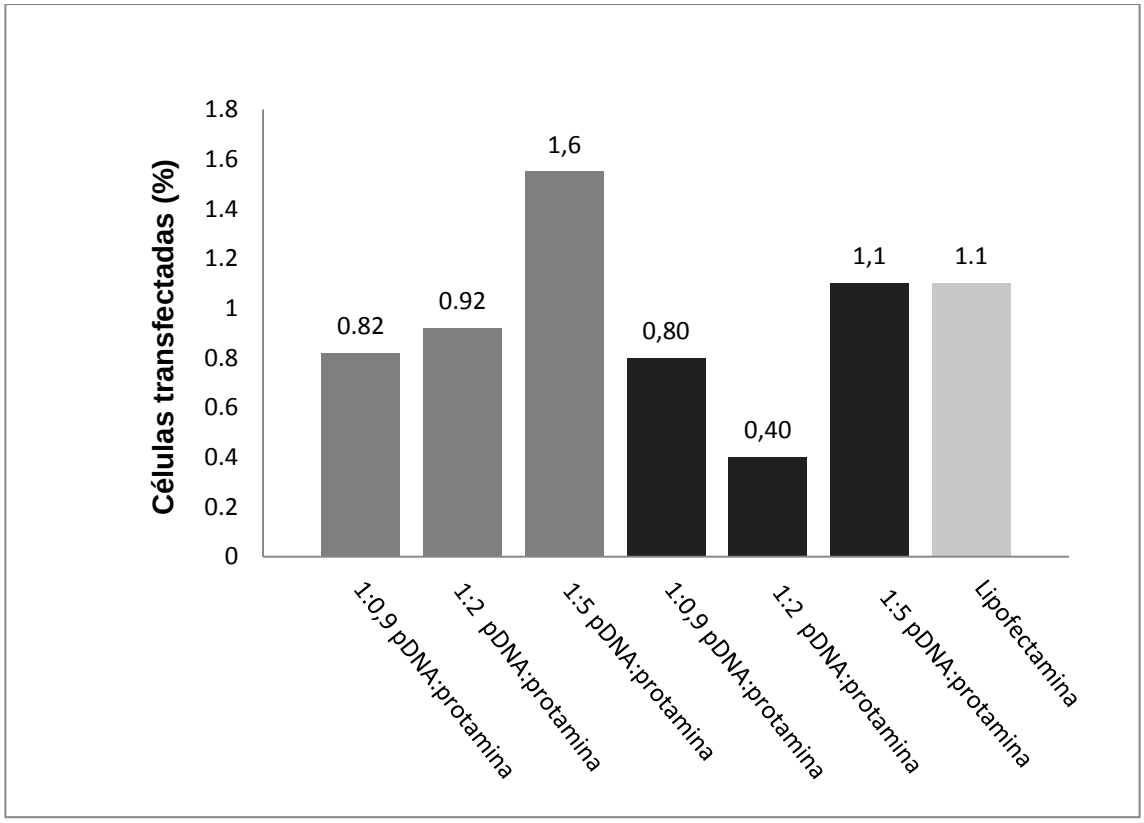

Figura 13. Eficiência de transfecção das células de macrófagos IC21 utilizando-se os complexos binários pDNA:protamina em diferentes relações mássicas (1:0,9; 1:2 e 1:5), além do lipoplexo pDNA:Lipofectamina (cinza claro). Os complexos foram preparados em tampão Hepes 40 mM a valores de pH 6,5 (cinza médio) e pH 8,5 (preto). Os valores apresentados representam a média de três poços transfectados em cada relação mássica mas analisados conjuntamente (10.000 eventos) por citometria de fluxo.

Uma pesquisa na literatura indicou que macrófagos são células difíceis de transfectar, o que explica os baixos valores encontrados (Kusumawati et al., 1999). Algumas linhagens de macrófagos são relativamente mais fáceis de serem transfectadas, como a J-774 (murina), ainda assim sendo necessárias massas de pDNA duas a quatro vezes maiores que as utilizadas em nosso trabalho (1 μg/poço). No entanto, ainda que preliminares, nossos resultados vão ao encontro dos estudos

apresentados na literatura, que indicam que partículas maiores são mais eficientes para a entrega de pDNA em macrófagos, uma vez que são fagocitadas. Partículas menores tendem a seguir a *via* de degradação em lisossomas sendo, portanto, rapidamente degradadas (Yue et al., 2010).

De forma a ampliar nossos estudos, foram também realizados ensaios de transfecção em células HeLa com complexos binários pDNA:protamina formados em tampão Hepes pH 6,5. Os resultados indicaram uma baixa capacidade de transfecção do complexo binário, sendo os valores encontrados na Figura 14. Devido ao baixo valor encontrado para os complexos binários pDNA:protamina, buscou-se aumentar a eficiência desses complexos pela combinação com a Lipofectamina, formando-se complexos ternários na forma de lipossomas contendo em seu interior os complexos binários. Mantendo-se constantes a massa de pDNA e Lipofectamina adicionada e variando-se apenas a relação mássica de protamina segundo os estudos anteriores (tampão Hepes pH 6,5), transfecções foram conduzidas em células HeLa (Figura 14).

Pode-se observar na Figura 14 que houve aumento da eficiência de transfecção em um padrão dose dependente com o aumento das relações mássicas de protamina (relações mássicas de 1:0,9, 1:1, 1:2, 1:5). Houve, portanto, um aumento da eficiência da transfecção da Lipofectamina com a adição da protamina, e o aumento da eficiência da transfecção foi diretamente proporcional ao aumento das relações mássicas, resultado esse semelhante ao encontrado por Ni et al. (1999), ao referir-se a maior eficiência quando utilizada a protamina nas transfecções. Os resultados encontrados também estão de acordo com Alves (2013), ao demonstrar que complexos pDNA:proteína encapsulados em lipossomas são mais eficientes em transfectar células HeLa. Nesse caso, a proteína utilizada foi

a T-Rp3 recombinante, e o lipossoma foi formado por uma mistura de três lipídeos (DOPE, EPC e DOTAP).

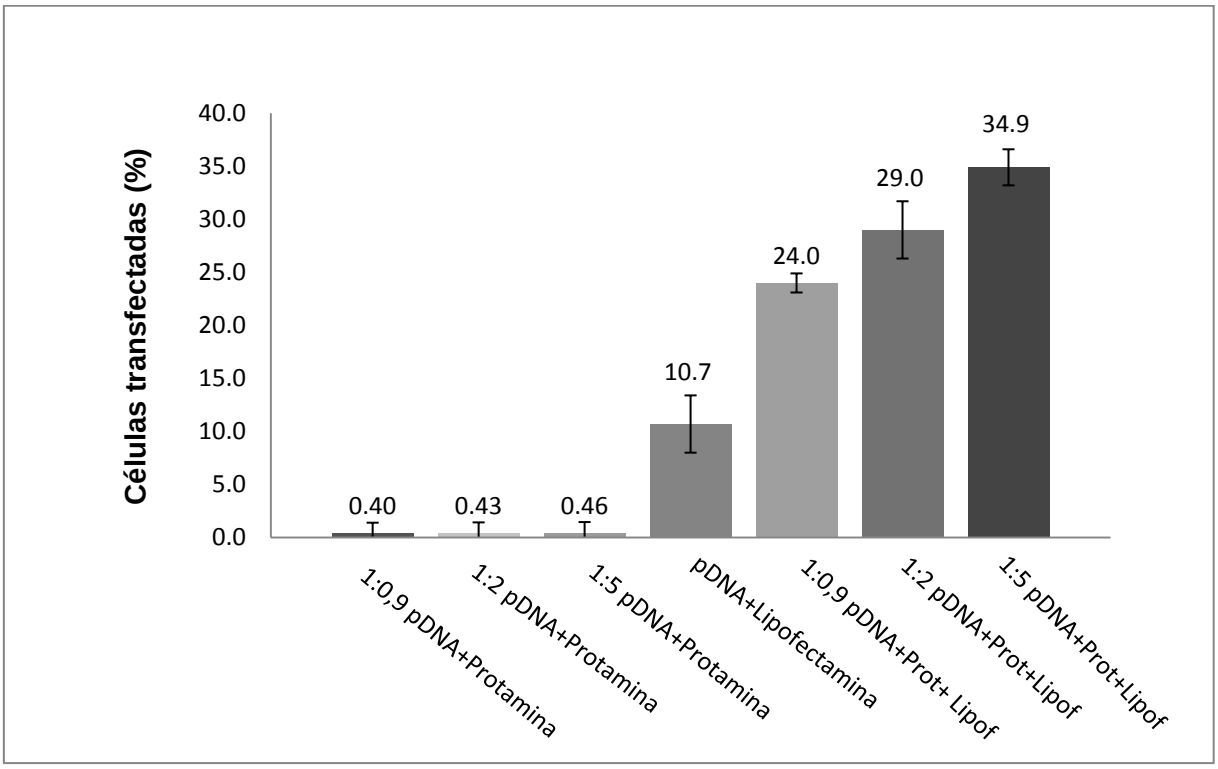

Figura 14. Eficiência de transfecção das células HeLa utilizando-se os complexos binários pDNA:protamina em diferentes relações mássicas (1:0,9; 1:2 e 1:5), além dos lipossomas pDNA:Lipofectamina e pDNA:protamina:Lipofectamina nas diferentes relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos foram preparados em tampão Hepes pH 6,5. Os valores apresentados representam a média de três poços transfectados em cada relação mássica (10.000 eventos) por citometria de fluxo.

Ainda que existam trabalhos na literatura mostrando que a adição de protamina à lipídeos catiônicos tende a aumentar a eficiência de transfecção, provavelmente devido à eficiência de translocação nuclear (Dokka et al., 2000), pouco foi descrito até o momento sobre possíveis alterações de carga superficial e tamanho do complexo ternário (lipossoma) causadas pela presença da protamina em diferentes relações mássicas e condições de complexação.

5.4. Características Físico-Químicas dos Complexos Ternários pDNA:Protamina:Lipofectamina na Presença de Meio e Soro

De forma a compreender se os efeitos causados pelo aumento da massa de protamina nos complexos ternários estão relacionados ou não a diferenças físico-químicas dos complexos, buscamos determinar o tamanho, polidispersidade e potencial zeta de complexos pDNA:protamina:Lipofectamina. As condições de complexação procuraram mimetizar aquelas encontradas no protocolo de transfecção utilizado nos dados apresentados na Figura 14. Sendo assim, também buscamos avaliar os efeitos causados pela presença do meio de cultivo F12, além da presença de soro fetal bovino na porcentagem final de 10%. Os resultados são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta dos complexos pDNA:protamina com Lipofectamina, na presença de meio F-12 **sem soro fetal bovino.**

Relação mássica pDNA:protamina	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
1:0	564 ± 105	0,77 ± 0,16	-6,49 ± 4,26
1:0,9	657 ± 299	0,76 ± 0,20	12,27 ± 3,17
1:2	811 ± 275	0,76 ± 0,20	5,67 ± 0,82
1:5	1071 ± 542	0,74 ± 0,20	1,46 ± 0,2

Tabela 15. Diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta dos complexos pDNA:protamina com Lipofectamina, na presença de meio F-12 **com soro fetal bovino**.

Relação mássica pDNA:protamina	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
1:0	493 ± 301	0,83 ± 0,14	0,64 ± 1,93
1:0,9	697 ± 207	0,92 ± 0,10	-4,78 ± 3,72
1:2	780 ± 243	0,91 ± 0,12	-1,44 ± 3,3
1:5	604 ± 370	0,91 ± 0,13	0,18 ± 2,64

As Figuras 15 e 16 apresentam a variação do tamanho dos complexos de acordo com a relação mássica de protamina utilizada, com ou sem a presença de soro fetal bovino no meio de complexação. Em ambos os casos, observa-se que a relação mássica de protamina altera o tamanho e a carga dos complexos pseudoternários, especialmente na ausência de soro. Além disso, provavelmente devido aos potenciais zeta mais próximos da neutralidade encontrados nessas condições de complexação, os diâmetros das partículas tendem a aumentar significativamente com o tempo, como mostrado nas Figuras 17 e 18.

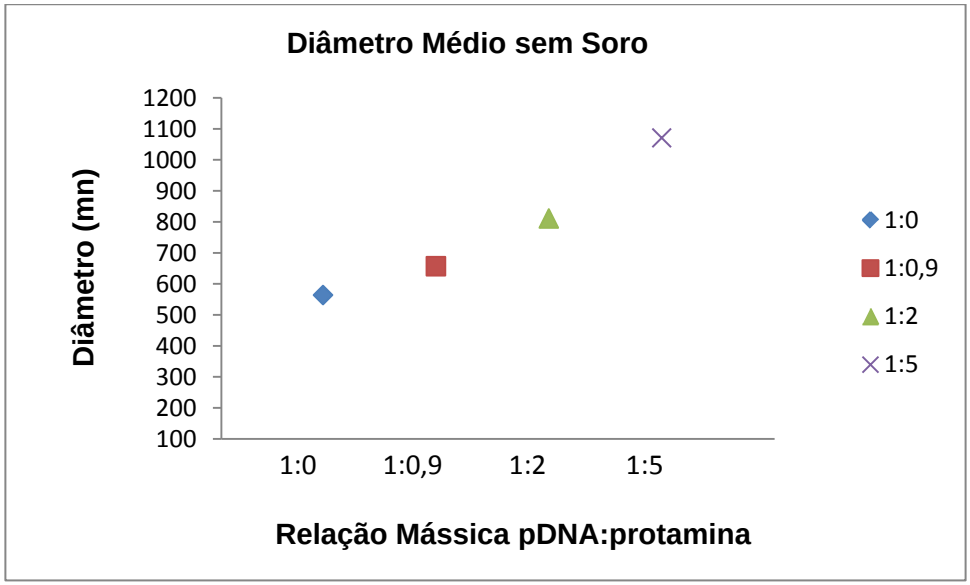

Figura 15. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:Lipofectamina em meio F-12, **sem a presença de soro**, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio.

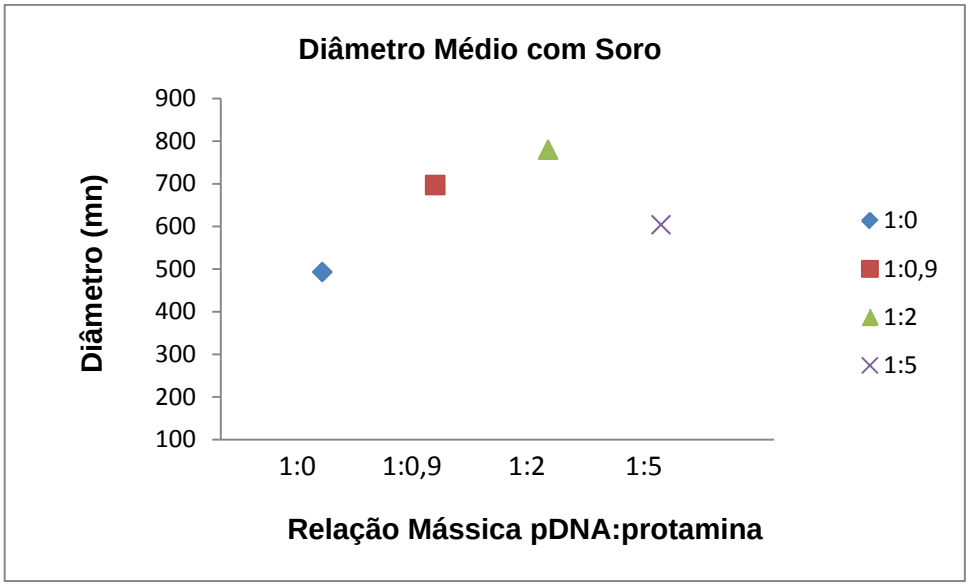

Figura 16. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternario pDNA:protamina:lipofectamina em meio F-12 com 10% de Soro Fetal Bovino, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio.

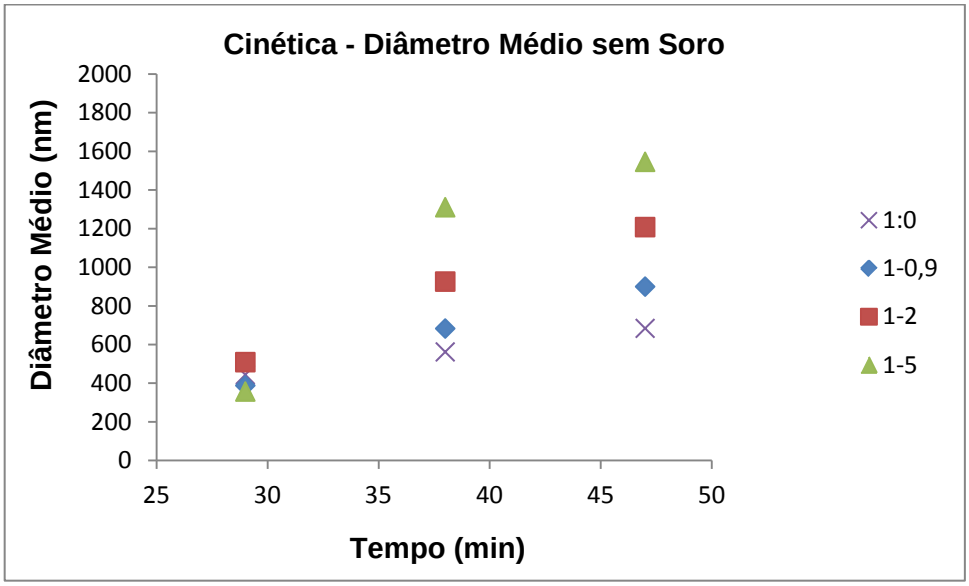

Figura 17. Determinação da cinética de variação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:Lipofectamina em meio F-12 **sem soro**, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários, antes da adição de lipofectamina, foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio.

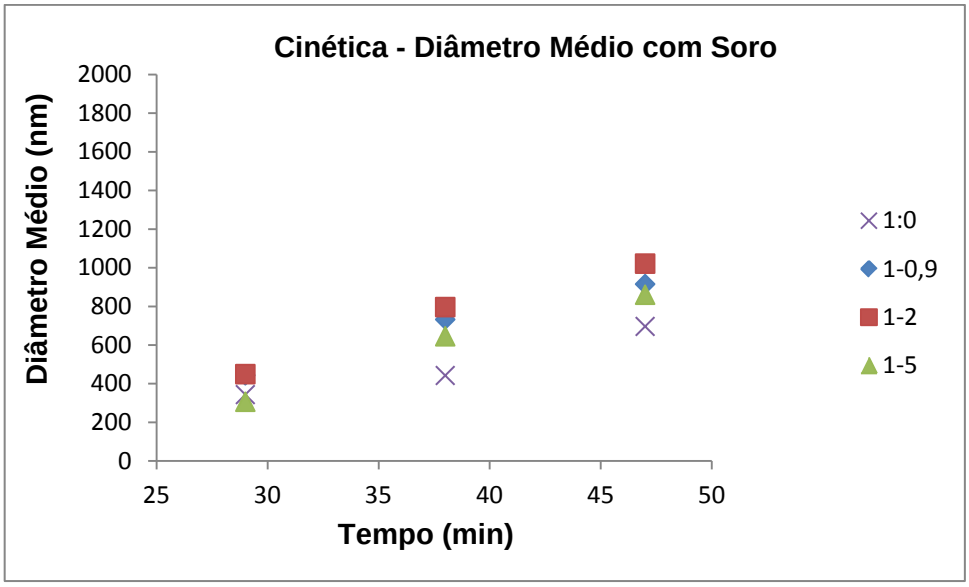

Figura 18. Determinação da cinética de variação do diâmetro hidrodinâmico médio de partículas do complexo psedoternário pDNA:protamina:Lipofectamina em meio F-12 **com soro**, em várias relações mássicas pDNA:protamina. Os complexos binários, antes da adição de lipofectamina, foram formados em tampão Hepes pH 6,5. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentado o valor médio.

Em resumo, nossos resultados mostram que complexos pseudoternários catiônicos assumem cargas superficiais próximas de zero, ou mesmo negativas, quando presentes em soluções contendo meio de cultura, e em especial na presença de soro fetal bovino. Além disso, tanto a carga como o tamanho podem ser afetados pela relação mássica de protamina nos complexos. Finalmente, os resultados indicam que a adição de soro em complexos já formados, em meio F-12, pode alterar rapidamente as características desses complexos sem, no entanto, impossibilitar a transfecção.

Enquanto a ligação de partículas catiônicas (como nossos lipossomas) sobre a superfície da célula é conceitualmente simples, alguns poucos trabalhos caracterizando partículas na presença de soro, levantam informações que tornam mais complexo o entendimento sobre os mecanismos por trás das transfecções

(Kim et al. 2003; Doorley e Payney, 2010).

O meio de cultura no qual as células são cultivadas consiste tipicamente de dois principais componentes. O meio em si é uma solução aquosa de aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e glicose. No entanto, em cultura de células o meio costuma ser suplementado com soro, sendo esse uma solução proteica complexa obtida a partir do sangue de bovinos, cavalos ou outros animais. Enquanto que o meio é uma solução cuidadosamente controlada e definida, o soro é uma mistura altamente complexa e variada de proteínas (Doorley e Payney, 2010). Artigos recentes que tratam da interação de nanopartículas com moléculas presentes no soro sugerem um modelo em que as nanopartículas catiônicas ligam-se rapidamente a uma mistura de proteínas aniônicas presentes no soro (BSA, por exemplo). No entanto, esses trabalhos mostram que a partícula resultante, muitas vezes aniônica em sua carga, ainda assim pode interagir com a membrana celular e proteínas aniônicas presentes na superfície das células. De particular interesse, nesse caso, é a forma como este complexo formado pelas proteínas do soro e as nanopartículas interage com a superfície da célula. Os estudos têm mostrado que as proteínas aniônicas do soro presentes no exterior das nanopartículas acabam por ser deslocadas devido a uma maior afinidade entre a nanopartícula catiônica e proteínas aniônicas presentes na superfície das membranas das células, iniciando assim o processo de endocitose (Doorley e Payney, 2010).

Dessa forma, nossos resultados indicam que as características físico-químicas de um complexo são altamente dependentes das condições encontradas no momento da complexação. Ainda assim, essas características serão afetadas pela presença de meio e soro encontradas nas soluções de transfecção. Portanto, a eficiência de transfecção de uma partícula será o resultado de características físico-

químicas e funcionais altamente complexas, o que explica a alta variabilidade desses ensaios e imprevisibilidades relacionadas às transições para os modelos in vivo. Assim, nossos estudos indicam que, antes que um determinado vetor seja testado *in vitro* e, principalmente, *in vivo*, um completo estudo de caracterização físico-química deve ser desenvolvido, de forma a avaliar e, na medida do possível, procurar prever o comportamento dessas partículas nas condições de complexação, armazenamento e ensaio, buscando assim otimizar a eficiência desses vetores.

6. Conclusões

Avaliamos o efeito do tipo de tampão, pH e força iônica (concentração de NaCl) sobre o tamanho, polidispersidade e potencial zeta de partículas formadas pela complexação de pDNA com a proteína protamina. Os resultados indicam que valores mais elevados de pH levam ao aumento do diâmetro e polidispersidade das partículas, provavelmente devido ao desprotonamento de grupos carregados positivamente da protamina. Essa explicação também é coerente com os resultados encontrados para a variação do potencial zeta com o pH. Nossos resultados indicam que o valor do potencial zeta diminui com o aumento do pH. No caso do efeito da força iônica, constatou-se que o aumento da concentração de NaCl no ambiente de complexação leva a formação de partículas maiores mas com valores de potencial zeta também maiores (em módulo). Os estudos também indicaram que o tampão fosfato leva à formação de partículas maiores e de maior polidispersidade que o tampão Hepes, provavelmente devido à formação de pontes salinas entre as partículas pela presença de íons fosfato (contendo várias cargas negativas).

Os estudos de transfecção de células em cultura mostraram que as partículas formadas por pDNA:protamina possuem baixa capacidade de transfecção, sendo necessário o encapsulamento em lipossomas (Lipofectamina) para que níveis quantificáveis de transfecção fossem obtidos. Nesse caso, foi observada uma correlação positiva entre o aumento da relação mássica de protamina e o aumento da eficiência de transfecção. A caracterização desses complexos pseudoternários na presença de meio de cultura e soro mostrou que, ao contrário do que se esperava, esses complexos assumem tamanhos elevados e potenciais zeta baixos (ou mesmo

negativos), sem que isso impossibilite a transfecção.

Por fim, este trabalho vem acrescentar novas informações no sentido de que a eficiência de transfecção de uma partícula será o resultado de características funcionais e físico-químicas altamente complexas, que poderão depender, além da própria composição, também das condições de pH, força iônica, tipo dos sais inorgânicos, presença ou não de soro, etc, encontradas durante a formação e entrega dessas partículas. Isso ajuda a explicar a alta variabilidade desses ensaios *in vitro* e também as imprevisibilidades relacionadas às transições para os modelos *in vivo*.

7. Sugestões para Próximos Trabalhos

Como sugestão para futuros estudos dentro do tema deste trabalho, estudos poderiam ser desenvolvidos no sentido de:

- Realizar ensaios de formação e caracterização de complexos binários e ternários, variando o pH e a força iônica, nas mesmas relações mássicas estudadas, todos na presença de meio e soro.

- Realizar ensaios de transfecção em diferentes linhagens de macrófagos, como a J-774, utilizando o complexo formado por pDNA:protamina:Lipofectamina, nas relações mássicas estudadas neste trabalho.

- Realizar estudos de citotoxicidade utilizando os complexos pDNA:protamina:Lipofectamina, formados em diferentes condições.

8. Referencias Bibliográficas

ALVES, R. F. **Desenvolvimento e caracterização de vetores não virais para entrega gênica baseados em proteínas e lipossomas**. 2013. 92 p. Dissertação de Mestrado- Universidade de São Paulo – Escola Politécnica, 2013-10-24.

AUDOUY, S. L. et al. In Vivo Characteristics of Cationic Liposomes as Delivery Vectors for Gene Therapy. **Pharmaceutical Research,** v. 19, n. 11, p. 1599-1605, 2002/11/01 2002.

AZZONI, A. et al. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. **J Gene Med**, v. 5, p. 392-402, 2007.

BUXTON, G. V. et al. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (·OH/·O− in Aqueous Solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, 1988, p. 514-886.

CARNEIRO-DA-CUNHAA, M. G. et al. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production. **Carbohydrate Polymers,** v. 85, n. 3, p. 522–528, 1 June 2011 2011.

CHANG, H. I.; YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **Int J Nanomedicine,** v. 7, p. 49-60, 2012.

CONWELL, C. C.; HUANG, L. Recent advances in non-viral gene delivery. **Adv Genet,** v. 53, p. 3-18, 2005.

DE LA TORRE et al . The synergy between structural stability and DNA-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 73: 175-84 p. 2009.

DOORLEY, G. W.; PAYNE, C. K. Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins. **Chem. Commun**, v**.** 47,p. 466-468 2010.

DOKKA, S. et al. High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. **International Journal of Pharmaceutics,**v. 206, n. 1-2, p. 2000, 97–104.

EBATCO^{TM}. **Electrophorectic Light Scattering Particle Analysis,** 2007, disponível em .www.ebatco.com, 06/09/2015

EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. **The Journal of Gene Medicine,** v. 9, n. 10, 2007, p. 833-842.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release,** v. 94, n. 1, 2004, p. 1-14.

FAVARO, M. T. P. et al. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. **Journal of Biotechnology,** v. 173, 2014, p. 10-18.

FELGNER, J. H. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 269, n. 4, 1994 p. 2550-61.

FERGUSON J, W. et al. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** p. 300-310, 1979.

FERRER-MIRALLES, N.; VAZQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. **Trends Biotechnol,** v. 26, n. 5, p. 267-75,2008.

FRIEDMANN, T. A brief history of gene therapy. **Nat Genet,** v. 2, n. 2, p. 93-98, 1992.

HAYASHI, K. et al. Membrane interaction between Span 80 vesicle and phospholipid vesicle (liposome): Span 80 vesicle can perturb and hemifuse with liposomal membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 106, p. 258–264, 1 June 2013 2013.

HEDGECOE, A. M. Gene Therapy. In: CHADWICK, R. (Ed.). **Encyclopedia of Applied Ethics (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. p.407-413.

HERSHFIELD, M. S. IMMUNODEFICIENCY CAUSED BY ADENOSINE DEAMINASE DEFICIENCY. **Immunology and Allergy Clinics of North America,** v. 20, n. 1, p. 161-175, 2000.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóidesundo dos colóides**. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, n .9 ,1999.

KATAOKA, K., OANA, H. et al. Spontaneous formation of giant unilamellar vesicles from microdroplets of a polyion complex by thermally induced phase separation. **Angew Chem Int Ed Engl,** v. 48, n. 25, p. 4613-6, 2009.

KASZUBA,M.; WATSON,F,M.; JONES,A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Phil. Trans. R. Soc. A.** 368 4439–4451 p. 2010.

KHALIL, I. A. et al. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacol Rev,** v. 58, n. 1, p. 32-45, Mar 2006.

KIM, Y.J. et al. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils International **Journal of Pharmaceutics** 252, 2003, 241–252.

KUO, Y.-C.; WANG, C.-C. Colloidal drug delivery system for brain-targeting therapy. In: MAKINO, H. O. (Ed.).**Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p.389-410.

KUSUMAWATI, A. et al. Transfection of Myelomonocytic Cell Lines: Cellular Response to a Lipid-Based Reagent and Electroporation. **Analytical Biochemistry,** v. 269, n. 1, p. 219-221, 1999.

LASIC, D. D. **Liposomes: From Physics to Applications**. Elsevier Science Ltd: 1993.

LA VEGA et al. Impact of Plasmid Quality on Lipoplex-Mediated Transfection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, 2013, p. 1-10.

LEVY, J. H.; CORMACK, J. G.; MORALES, A. Heparin Neutralization by Recombinant Platelet Factor 4. **Anesthesia & Analgesia,** v. 81, n. 1, 1995, p. 35-37.

LYKLEMA . Fundamentals of Interface and Colloid Science. **UK: Academic Press**, 2000.

MELCHIORRI, D. et al. Regulatory evaluation of Glybera in Europe [mdash] two committees, one mission. **Nature Reviews Drug Discovery,** v. 12, p. 719-719, 2013.

MOSCHOS, S. A. et al. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. **Bioconjug Chem,** v. 18, n. 5, p. 1450-9, 2007.

NAYEROSSADAT et al. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. In: (Ed.). **Adv Biomed Res**, v.1, 2012.

NEW, R. R. C. **Liposomes: A Practical Approach (The Practical Approach Series)**. Oxford University Press: 1990.

NITIN et al. Tat Peptide Is Capable of Importing Large Nanoparticles Across Nuclear Membrane in Digitonin Permeabilized Cells. **Annals of Biomedical Engineering,** v. 37, n. 10, p. 2018-2027, 2009.

NOMANI, A. H. et al. Intracellular gene delivery is dependent on the type of non-viral carrier and defined by the cell surface glycosaminoglycans. **Journal of Controlled Release,** v. 187, n. 0, p. 59-65, 2014.

PARK et al. Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex (1). **Journal of Controlled Release**, 2003, p. 349–359.

PEREIRA, V. B. et al. DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. **World Journal of Vaccines,** v. 4, p. 50 - 71, 2014.

REJMAN, J. et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis.**Biochem J,** v. 377, n. Pt 1, p. 159-69, 2004.

REYNOLDS, F.; WEISSLEDER, R.; JOSEPHSON, L. Protamine as an efficient membrane-translocating peptide. **Bioconjug Chem,** v. 16, n. 5, p. 1240-5, 2005.

ROGERS, M.-L.; RUSH, R. A. Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery.**Journal of Controlled Release,** v. 157, n. 2, 2012, p. 183-189.

RUDOLPH, C. et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 278, n. 13, 2003, p. 11411-8.

SACCARDO, P.; VILLAVERDEA, A.; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N. Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy. **Biotechnology Advances,** v. 27, n. 4, p. 432–438, 2009.

SCHIEL, HAGE D.S. Density measurements of potassium phosphate buffer from 4 to 45 degrees C. **Talanta**, p. 495–500, 2005.

SORGI, F.; BHATTACHARYA, S.; HUANG, L. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. **Gene Therapy**. 4:961–968 p. 1997.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 3, p. 195-208, 2007.

STOLL, S. The Importance of Zeta Potential Measurements & Role of Ionic Strength in Flocculation Processes. **Water and Technology**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2013.

TOLEDO. et al. Development of a Recombinant Fusion Protein Based on the Dynein Light Chain LC8 for Non-viral Gene Delivery. **J Control Release**, n. 159, p. 222-231, 2012.

TSUCHIYA, Y. et al. Characterization of Protamine as a Transfection Accelerator for Gene Delivery. **SAGE Publications**, 2006..

VAN BEURTEN, P.; VRIJ, A. Polydispersity effects in the small- angle scattering of concentrated solutions of colloidal spheres.**The Journal of Chemical Physics,** v. 74, n. 5, 1981, p. 2744-2748.

VÁZQUEZ, E.; FERRER-MIRALLES, N.; VILLAVERDE, A. Peptide-assisted traffic engineering for nonviral gene therapy. **Drug Discovery Today,** v. 13, n. 23–24, p. 1067-1074, 2008.

WANG, T.; UPPONI, J. R.; TORCHILIN, V. P. Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 427, n. 1, p. 3-20, 2012.

WILSON, J. M. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism,** v. 96, n. 4, p. 151-157, 2009.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene,** v. 525, n. 2, p. 162-169, 2013.

YLÄ-HERTTUALA, S. Glybera's Second Act: The Curtain Rises on the High Cost of Therapy. **Molecular Therapy** 23: 217–218 p. 2015.

YUAN, H. et al. Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNA for gene delivery. In: (Ed.). **Int J Nanomedicine**, v.8, 2013. p.2859-69.

YUE, H. W. et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 41, n. 5, 2010, p. 650-657.

ZELPHATI O.; SZOKA FC Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**.: 11493-8 p. 1996.