BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
t: 19.299

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

INTERAÇÕES ENTRE DNA E VESÍCULAS CATIÔNICAS

IRENE SATIKO KIKUCHI
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA:
PROFª DRª ANA MARIA CARMONA-RIBEIRO

SÃO PAULO
24/11/2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003221

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Kikuchi, Irene Satiko
K47i Interações entre DNA e vesículas catiônicas / Irene Satiko Kikuchi. -- São Paulo, 2000.
1v (várias paginações)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Carmona-Ribeiro, Ana Maria

1. Lipossoma : Bioquímica 2. DNA 3. Nucleotídeo 1. T. II. Carmona-Ribeiro, Ana Maria, orientador.

574.19247 CDD

"INTERAÇÕES ENTRE DNA E VESÍCULAS CATIÔNICAS"

IRENE SATIKO KIKUCHI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ - USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ - USP

Profa. Dra. MARIA TERESA LAMY FREUND
IF - USP

Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA
FCF - UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
24 DE NOVEMBRO DE 2000.

Dedico este trabalho à minha Família.
Obrigada pela paciência e força.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela objetividade e competência na orientação do doutoramento e entusiasmo pela pesquisa.

À Profª Drª Wladia Viviani, pela colaboração na simulação em computador das interações entre DODAB/nucleotídeo.

À Profª Drª Mari Cleide Sogayar, pelo treinamento em cultivo de células de mamíferos.

Ao Prof. Dr. Santelli, pela presteza e uso de centrífugas e cintilador do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina, pela presteza e uso do espectrofluorímetro do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin, pelo uso do cintilador do seu laboratório.

À Profª Drª Aline Maria da Silva, pelo fornecimento de *E. coli* DH 5α.

À técnica Zizi de Mendonça, pelo acompanhamento durante treinamento com cultura de células de mamíferos e presteza sempre que solicitada.

À Drª Myriam Therezinha Neves Campanhã, pela força, amizade, incentivo durante todo o meu doutorado e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao pessoal do laboratório: Renata Rapuano, Edla Moraes de Abreu Pereira, Sônia Regina da Silva Mendes, pela amizade e companheirismo durante este período todo.

Ao Luiz Carlos Salay, pelo incentivo e amizade no início da pós-graduação.

Aos estagiários do laboratório: Denise, Allan, Fernando, Renata Cristina e Débora B. Vieira pela amizade.

À Dona Benedita de Oliveira, pela limpeza dos materiais.

À Sandra Regina de Souza e Débora C. J. Costa, também pela limpeza dos materiais.

Ao Instituto de Química, pelo uso de suas instalações para a realização do projeto.

Aos funcionários do Instituto de Química, pela presteza e ajuda sempre que solicitados.

À CAPES pelos 2 meses iniciais de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado e reserva técnica, para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

[AB] - concentração de "AB"

BSA - *bovine serum albumin*, albumina de soro bovino

CAT - cloranfenicol acetil transferase

Chol - colesterol

[^{14}C]Sacarose - sacarose radioativa

CLDC - complexo lipossomo catiônico/DNA

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio

DHP - dihexadecilfosfato de sódio

DMP - nucleotídeo 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (d'AMP)

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DC-Chol - 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol

DODAB - brometo de dioctadecildimetilamônio

DODAC - cloreto de dioctadecildimetilamônio

DOGS - dioctadecilamidoglicilespermina

DOPC - dioleoilfosfatidilcolina

DOPE - dioleoilfosfatidiletanolamina

DOTAP - N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamoniometilsulfato

DOTMA - N-1(1-2,3- dioleiloxipropil)-N,N,N-trimetilamônio

DOSPA - trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-
-propanamino

EDOPC - 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocolina

FBS - *fetal bovine serum*

FCS - *fetal calf serum*

H_{II} - estrutura hexagonal

HL - lipídio *helper*

HSA - *human serum albumin*, albumina de soro humano

L_{α} - estrutura lamelar

LDA - agregados de lipossomo/DNA

LDP - partículas de lipídio-DNA

LUV - vesículas unilamelares grandes

MC - merocianina 540

ME - mobilidade eletroforética

MH - meio de cultura Mueller Hinton

PBS - *phosphate buffer saline*, solução salina de tampão fosfato

SL - lipossomos estericamente estabilizados

SUV - vesículas unilamelares pequenas

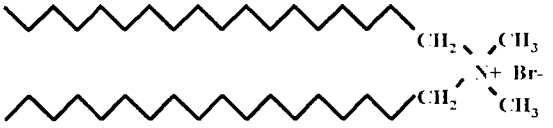
TSA - meio de cultura *Tryptic Soy Agar*

TSB - meio de cultura *Tryptic Soy Broth*

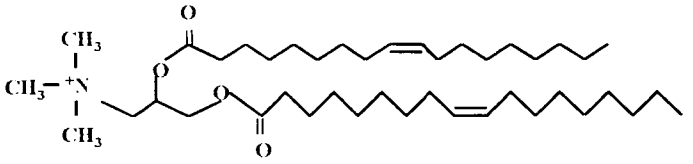
UFC - unidades formadoras de colônia

Estruturas químicas de lipídios citados no trabalho

Anfifílicos catiônicos:

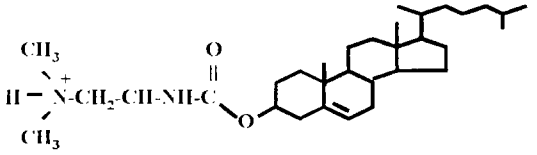


DODAB

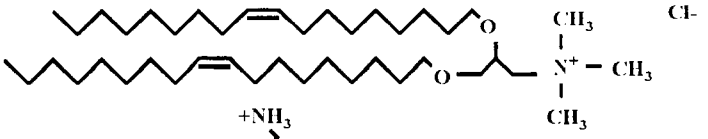


DOTAP

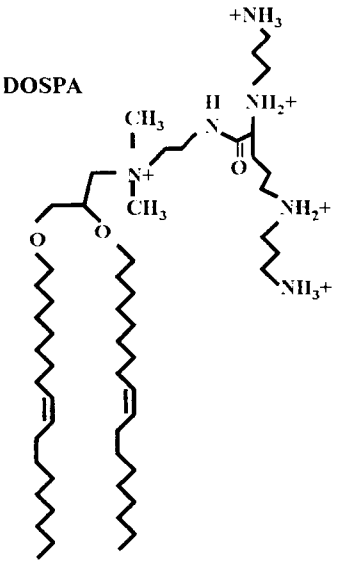
CTAB

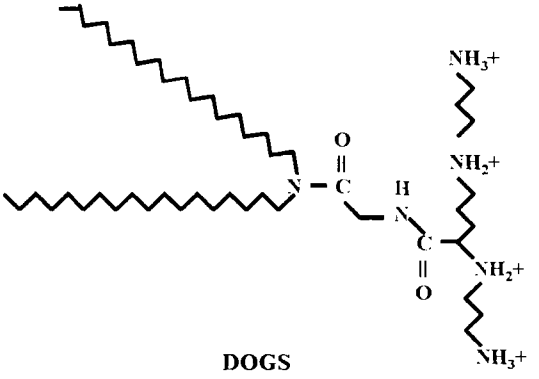


DC-Chol



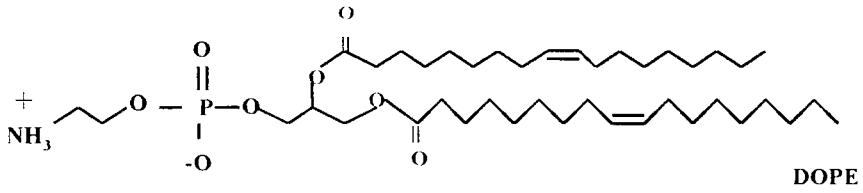
DOTMA



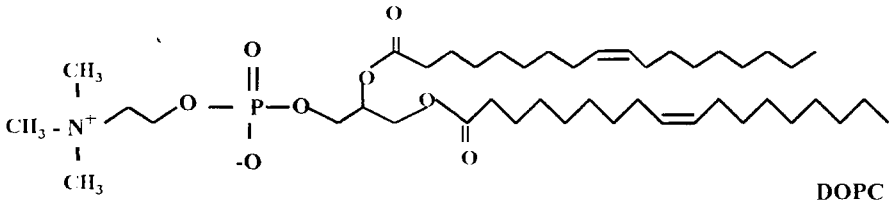


DOGS

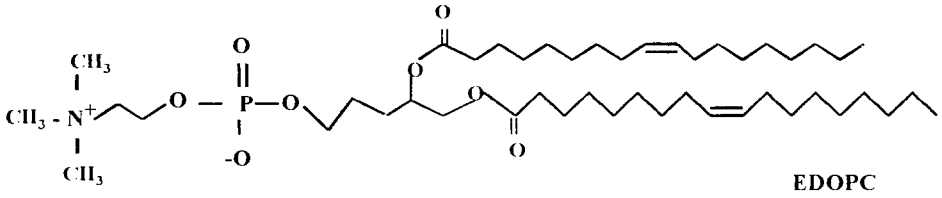
Anfifílicos neutros:



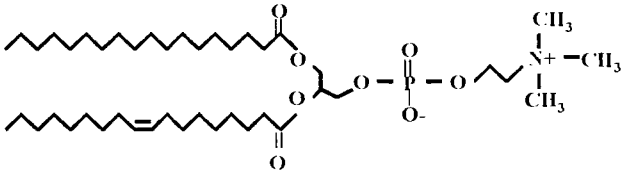
DOPE



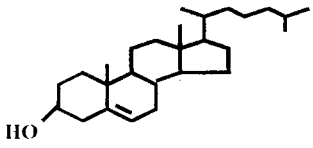
DOPC



EDOPC



PC



Colesterol

Anfifílico aniônico:

DHP

Resumo

Neste trabalho foram analisadas sob o ponto de vista físico-químico, as interações entre DNA e lipossomos catiônicos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).

Foram utilizados os seguintes modelos: 1) 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (DMP), um modelo de unidade monomérica do polímero que é o DNA; 2) DNAs de bacteriófagos T2, T4, T5, T7 e λ; 3) vesículas pequenas de DODAB preparadas por sonicação; 4) vesículas grandes de DODAB preparadas por aquecimento (56 °C/30 minutos) ou vaporização clorofórmica.

A interação entre 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (DMP) e lipossomos de DODAB resultou em adsorção máxima de DMP ao lipossomo catiônico com uma proporção molar DODAB : DMP de 2:1 e mobilidade eletroforética (ME) mínima mas positiva dos lipossomos. Em força iônica de 5 mM, a adsorção máxima de DMP sobre os lipossomos aproxima-se de zero, mostrando que a formação do complexo DODAB/DMP é essencialmente dirigida pela atração eletrostática. A adição de nucleotídeo na faixa de milimolar (0,4 - 1,5 mM) induz a um aumento de turbidez da dispersão de lipossomos (DODAB 0,08 mM) em função do tempo. Ocorrem velocidades de floculação muito maiores que as obtidas por adição de NaCl (40 - 120 mM). O nucleotídeo comporta-se como um ânion hidrofóbico com uma afinidade pela membrana muito maior que a exibida por um ânion simples como o cloreto. DMP induz ruptura dos lipossomos contendo [^{14}C]sacarose, sugerindo que a interação DMP/bicamada não é superficial. Embora a interação preserve a carga positiva do liposomo, a integridade lipossomal não é preservada. Na adsorção máxima, a inserção de DMP na bicamada é a explicação mais razoável para manutenção da carga positiva da vesícula, proporção molar DODAB : DMP de 2:1 e extravasamento de conteúdo interno lipossomal.

A interação DODAB/DNA também é dirigida por atração eletrostática entre o DNA e a bicamada catiônica. Marcadores incorporados ao DNA ou a sítios da bicamada são deslocados para a água devido à interação. Sob condições de excesso de DODAB, na situação de adsorção máxima de DODAB sobre DNA, existem cerca de 70 moléculas de DODAB por nucleotídeo de DNA e esta proporção não depende do tipo de DNA. A interação DODAB/DNA leva à formação de glóbulos visíveis por microscopia óptica de campo escuro e ocorrência de uma dependência linear entre turbidez e $1/\lambda^2$, onde λ é o comprimento de onda da luz incidente. Na condição de adsorção máxima de DODAB, a formação de complexos globulares DODAB/DNA causa perda de hipocromismo da dupla fita de DNA conforme detectado por

efeitos de temperatura sobre absorbância em 260 nm de misturas DNA/DODAB. Em suma, a interação de DODAB/DNA não é superficial: o lipossomo perde sua integridade e o DNA perde sua estrutura em dupla hélice, tornando-se fita simples. A atração hidrofóbica entre bases nitrogenadas de DNA e cadeias hidrocarbônicas dos lipídios catiônicos tem papel importante na determinação da estrutura do complexo.

Abstract

In this work, interactions between DNA and cationic liposomes made up of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) are evaluated from a physicochemical point of view.

The following models were used: 1) 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (DMP), a model of monomeric unity of polymer, the DNA; 2) DNAs of T2, T4, T5, T7 and λ bacteriophages; 3) small vesicles of DODAB prepared by sonication; 4) large vesicles of DODAB prepared by heating (56 °C/30 minutes) or by chloroform vaporization.

The interaction between 2'deoxyadenosine 5'-monophosphate (DMP) and cationic liposomes made up of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) in water is described. At maximal adsorption, the molar ratio DODAB/DMP is 2:1 and electrophoretic mobility for the liposomes attains a minimum at a positive value. At 5 mM ionic strength, maximal DMP adsorption on the liposome becomes close to zero, demonstrating that the electrostatic attraction essentially drives the DODAB/DMP complexation. Over the millimolar range of DMP concentrations (0.4-1.5 mM), upon nucleotide addition, turbidity of the liposome dispersion (0.08 mM DODAB) steeply increases as a function of time in contrast with the much smaller flocculation rates upon NaCl addition over a much higher range of NaCl concentrations (40-120 mM). The nucleotide behaves as a hydrophobic anion with an affinity for the membrane that is much higher than that exhibited by a simple anion as chloride. DMP-induced rupture of liposomes containing [^{14}C]sacarose was evaluated from dialysis of DMP/liposomes mixtures. In water, DMP-induced leakage of radioactive liposomal contents suggests that the DMP/bilayer interaction is not superficial. Although the interaction preserves the positive liposome charge, it doesn't preserve its integrity. At maximal adsorption, DMP insertion in the cationic bilayer is the most reasonable explanation for the remaining positive charge on the vesicle, the 2:1 DODAB : DMP molar ratio, and leakage of internal contents from the liposome.

The DODAB/DNA interaction is also driven by the electrostatic attraction between DNA and bilayer. Probes located on DNA or in the bilayer are displaced from their DNA or bilayer sites. Under conditions of DODAB excess, at maximal DODAB adsorption on DNA, there are ca. 70 DODAB molecules adsorbed per nucleotide on DNA, a molar proportion (MP) that does not depend on DNA type. The DODAB/DNA interaction led to formation of globules as visualized from dark-field optical microscopy and to occurrence of a linear dependence between

turbidity for the mixture and $1/\lambda^2$, where λ is the wavelength of incident light. At maximal DODAB adsorption, the formation of DODAB/DNA globular complexes causes loss of double-stranded DNA hypochromism as detected from temperature effects on DNA absorbance at 260 nm in the presence or absence of DODAB. In summary, liposome loses its integrity and DNA loses its double helix becoming single-stranded. The hydrophobic attraction between nitrogenous bases on DNA and hydrocarbon chains on liposome bilayers plays an important role in determining structure of the complex.

ÍNDICE

Conteúdo	*Páginas*
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico)	1
1.2- Lipossomos	3
1.3 - Vesículas de anfifílicos	5
1.4 - Lipossomos catiônicos e carreamento de genes	10
1.5 - Estrutura de complexos lipídio catiônico:DNA	14
1.6 - Fatores que influenciam a transfecção gênica	23
2 - OBJETIVOS	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Materiais	27
3.1.1 - Reagentes	27
3.1.2 - Materiais diversos	28
3.1.3 - Equipamentos	28
3.2 - Métodos	29
3.2.1 - Preparação das vesículas de DODAB	29
3.2.1.1 - Por sonicação	29
3.2.1.2 - Por aquecimento - método do Snippe	29
3.2.1.3 - Por vaporização clorofórmica	30
3.2.2 - Determinação da adsorção de nucleotídeo DMP em lipossomos de DODAB	30
3.2.3 - Obtenção das isotermas de adsorção de DMP sobre vesículas de DODAB	32
3.2.4 - Determinação da concentração de nucleotídeo DMP adsorvido sobre vesículas de DODAB	37
3.2.5 - Linearização das isotermas de adsorção de DMP pelo modelo de Langmuir	37
3.2.6 - Determinação do efeito de NaBr sobre a adsorção de nucleotídeo às vesículas de DODAB	38
3.2.7 - Determinação do efeito de D-Glicose nas interações DODAB/nucleotídeo	41
3.2.8 - Determinação do efeito de NaCl sobre a estabilidade de vesículas de DODAB	41
3.2.9 - Determinação da cinética de floculação de lipossomos de DODAB induzida pelo DMP	43
3.2.10 - Determinação de mobilidade eletroforética (ME) dos lipossomos em presença de DMP	43
3.2.11 - Determinação da mobilidade eletroforética das partículas em misturas de DNA e DODAB	47
3.2.12 - Determinação da eficiência de incorporação de [^{14}C]sacarose em função da concentração de DODAB	49
3.2.12.1 - Preparação de vesículas de DODAB com conteúdo radioativo	50

3.2.12.2 - Diálise das amostras 50

3.2.12.3 - Preparação do líquido de cintilação 51

3.2.12.4 - Leituras de radioatividade 51

3.2.12.5 - Cálculo de eficiência de incorporação de [^{14}C]sacarose em vesículas de DODAB 52

3.2.13 - Determinação da ruptura vesicular (%R) pela interação DODAB/DMP 52

3.2.13.1 - Diálise convencional em saquinhos de celulose 52

3.2.13.2 - Diálise de equilíbrio 53

3.2.14 - Determinação da ruptura vesicular pela interação DODAB/DNA 54

3.2.15 - Otimização da geometria de inserção do nucleotídeo na bicamada 56

3.2.16 - Determinação das concentrações de DNAs do mercado através de determinação de fosfato 56

3.2.17 - Determinação da adsorção de vesículas de DODAB (SUV) aos DNAs de bacteriófagos 58

3.2.17.1 - Adsorção de vesículas de DODAB ao DNA de bacteriófagos T4 e λ 58

3.2.17.2 - Adsorção de vesículas de DODAB ao DNA de bacteriófagos T2, T5 e T7 59

3.2.18 - Determinação do deslocamento de cromóforos ou marcadores fluorescentes pela interação DNA/membrana catiônica 60

3.2.18.1 - Deslocamento de Merocianina a partir da bicamada 61

3.2.18.2 - Deslocamento de marcador fluorescente (DAPI) a partir dos sulcos menores de DNA 62

3.2.19 - Determinação do efeito do DODAB sobre hipocromismo de DNA dupla fita 64

3.2.20 - Transformação da bactéria Escherichia coli DH 5α 65

3.2.20.1 - Obtenção de bactérias competentes 65

3.2.20.2 - Transformação das bactérias competentes usando DODAB 66

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

4.1 - Quantificação da adsorção de nucleotídeo ao DODAB 70

4.1.1 - Obtenção das isotermas de adsorção do nucleotídeo sobre vesículas de DODAB 70

4.1.2 - Efeito da temperatura de interação DODAB/nucleotídeo na proporção molar DODAB:DMP 72

4.1.3 - Efeito da preparação de vesículas de DODAB em solução de DMP 74

4.1.4 - Efeito do NaBr 5 mM 75

4.1.5 - Efeito da solução de D-Glicose 0,264 M 78

4.1.6 - Linearização das isotermas de adsorção pelo modelo de Langmuir 78

4.2 - Efeito da concentração de NaCl sobre velocidade de floculação de vesículas de DODAB 80

4.3 - Nucleotídeo como um ânion hidrofóbico de alta afinidade pelas bicamadas catiônicas em água 81

4.4 - Correlação entre mobilidade eletroforética mínima e adsorção máxima de nucleotídeo 83

4.5 - Inserção hidrofóbica de nucleotídeo na bicamada catiônica 88

4.5.1 - Eficiência de incorporação de vesículas de dODAB em função da [DODAB] 89

4.5.2 - Ruptura de vesículas unilamelares grandes de DODAB induzida por nucleotídeo 91

4.6 - Mobilidade eletroforética positiva para o complexo DODAB/DNA 94

4.7 - Caráter globular de complexos DODAB/DNA por turbidimetria e lei de Joebst 98

4.8 - Quantificação da adsorção de DODAB ao DNA de bacteriófagos (λ, T2, T4, T5 e T7) 103

4.9 - Deslocamento de Merocianina 540 ou DAPI pela interação DNA/membrana catiônica 104

4.10 - Ruptura de vesículas de DODAB induzida pelo DNA 108

4.11 - Separação de fitas no DNA duplex 110

4.12 - Transformação de Escherichia coli DH 5α usando DODAB 118

5 - CONCLUSÕES 123

6 - PERSPECTIVAS 125

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 127

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico)

O DNA é um polímero de unidades de desoxirribonucleotídeo. Um nucleotídeo consiste de uma base nitrogenada, um açúcar e um ou mais radicais fosfato. O açúcar em um desoxirribonucleotídeo é a desoxirribose. A base nitrogenada é um derivado de purina ou pirimidina. As purinas no DNA são a adenina (A) e a guanina (G), e as pirimidinas são a timina (T) e citosina (C) (Stryer, 1992).

O DNA é uma molécula estruturalmente dinâmica que pode existir sob uma variedade de formas helicoidais: A, B (a hélice clássica de Watson-Crick) e Z. Nestes DNAs, dois filamentos com sentidos opostos são mantidos unidos pelos pareamentos de bases tipo Watson-Crick e interações de bases do mesmo filamento. A seqüência açúcar-fosfato de um filamento está do lado externo e as bases nitrogenadas estão do lado interno da dupla hélice. Os DNAs A e B são hélices com giro para a direita nas quais a unidade de repetição é um mononucleotídeo. No B-DNA, os pares de bases são quase perpendiculares ao eixo da hélice, enquanto no A-DNA, eles estão inclinados. A desidratação induz à transição de B para A-DNA. O DNA Z é uma hélice para a esquerda em que a unidade de repetição é um dinucleotídeo. A maioria do DNA em um genoma está na forma de hélice B de Watson-Crick. Uma importante característica estrutural da hélice B é a presença de sulcos maior e menor, que apresentam diferentes aceptores e doadores potenciais de hidrogênios, de acordo com sua seqüência de bases (Stryer, 1992). Ainda, para uma umidade relativa pequena (até 60%), o DNA assume a forma A, para uma umidade mais alta assume a forma B hexagonal e mais tarde, foi descoberta a forma C, em que o DNA é voltado para a direita e é da "família" da forma B-DNA (Volkenshtein, M.V., 1985).

O DNA é encontrado na natureza na forma de dupla hélice, constituído por duas cadeias de polinucleotídeos enrolados entre si, cujas bases nitrogenadas estão unidas em pares através de pontes de hidrogênio. A adenina (A) de uma cadeia está ligada com a timina (T) da outra, e a guanina (G) com a citosina (C). Assim, duas cadeias de DNA são complementares entre si e antiparalelas (Volkenshtein, M.V., 1985).

Durante a replicação, a dupla hélice se separa como conseqüência da ruptura das pontes de hidrogênio e do enrolamento das cadeias. Cada uma delas serve de matriz para uma nova cadeia complementar. Os monômeros da nova cadeia se unem com a matriz, formando os pares de Watson-Crick AT, TA, GC e CG e duas hélices duplas, idênticas à inicial. Este é o chamado modelo semiconservativo (Volkenshtein, M.V., 1985).

As soluções de DNA são muito viscosas. O DNA está enrolado e sua rigidez é grande, sendo que o seu comprimento em NaCl 0,15 M é igual a 50 nm, em NaCl 0,0014 M é de 80 nm. O comprimento de 50 nm aproximadamente corresponde a 150 espirais de nucleotídeos (Volkenshtein, M.V., 1985).

A densidade do DNA, próxima a 1,7 g/cm^3, cresce linearmente ao aumentar o conteúdo de G+C. A cada por cento de GC corresponde um aumento de densidade de 0,00103 g/cm^3 (Volkenshtein, M.V., 1985).

Durante o aquecimento ou mudança de pH, ocorre denaturação do DNA, em que esta molécula em dupla hélice origina duas cadeias separadas. Com isto, diminui-se fortemente a viscosidade e a intensidade de absorção na região de 260 nm aumenta. A dupla hélice possui nesta região, um hipocromismo muito grande, sendo que os ácidos nucleicos espiralados têm a intensidade de absorção muito menor que nos denaturados (Volkenshtein, M.V., 1985).

A temperatura de fusão da dupla hélice depende linearmente do conteúdo de pares GC. Durante a fusão, as pontes de hidrogênio entre as bases são substituídas por ligações com moléculas de água e por isso, é pequena a diferença de energias das pontes de hidrogênio na espiral e na fita única, mas também devem existir outros fatores que estabelecem a dupla hélice. A temperatura de fusão do DNA aumenta com o aumento da força iônica da solução, aproximadamente proporcional ao logaritmo da concentração de cátions. Os cátions são necessários para formar espirais, pois compensam as cargas dos grupos fosfato, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias (Volkenshtein, M.V., 1985).

As cadeias do DNA denaturadas são capazes de se renaturar, formando de novo a dupla hélice. Durante o resfriamento lento, o DNA denaturado restabelece parcialmente a atividade biológica e o efeito hipocrômico (Volkenshtein, M.V., 1985).

As moléculas pequenas em vários casos influem substancialmente na função biológica do DNA e RNA. Algumas são mutagênicas, enquanto outras inibem a transcrição. Por exemplo, moléculas do tipo dos corantes acridínicos estratificam-se entre os pares de bases na dupla hélice do DNA ou situam-se em um sulco menor sobre a superfície da dupla hélice (Volkenshtein, M.V., 1985).

1.2 - Lipossomos

Lipossomos são estruturas esféricas compostas de bicamadas concêntricas simples ou múltiplas, resultantes da auto-associação de moléculas anfifílicas, tais como fosfolipídios, em um meio aquoso. Os grupos da cabeça polar são localizados na superfície das membranas, em contato com o meio, enquanto as cadeias de ácido graxo formam o centro hidrofóbico das membranas, protegido da água (Vide Figura 1.1). Estas vesículas têm parte da fase aquosa no seu interior e, conseqüentemente podem capturar e segregar moléculas polares; além disso, por causa das propriedades físico-químicas de seus constituintes, podem também dissolver moléculas hidrofóbicas em suas bicamadas. Lipossomos podem ser preparados com muitos tamanhos diferentes, variando de vesículas unilamelares pequenas (SUV - *small unilamellar vesicules*), cujo menor diâmetro pode ser de cerca de 20 nm, até vesículas unilamelares gigantes (GUV - *giant unilamellar vesicles*) com diâmetro de dezenas de μm. Pertencendo à primeira geração de lipossomos, estão as vesículas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicles*) com várias centenas de nm em diâmetro (Bangham, 1965), e as mais recentes vesículas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*), caracterizadas por volumes de captura alta, com diâmetro ajustável (100 ou 200 nm) e tamanho reduzido por extrusão através de membranas específicas (Schuber, F. et al., 1998).

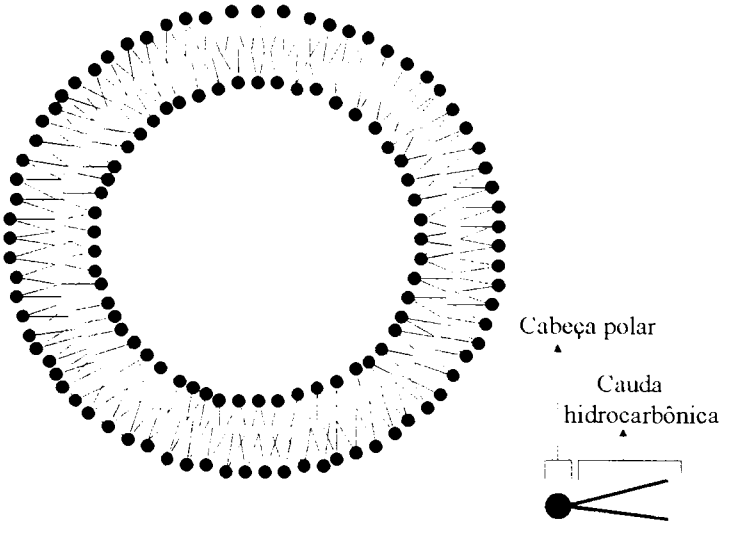


Figura 1.1 - Estrutura de uma vesícula unilamelar.

Em essência, os liposomos são estruturas altamente versáteis cujas propriedades podem ser moduladas por mudança nos parâmetros tais como tamanho, lamelaridade, composição das bicamadas, cargas e propriedades de superfície. A química dos (fosfo)lipídios, que são os constituintes de lipossomos, permite planejar análogos com novas propriedades e derivados a serem ligados à superfície das vesículas. Lipossomos têm atraído um enorme interesse:

i) na pesquisa básica (Química e Biologia) como modelos de membrana, mas também oferecem atraentes possibilidades para confinamento de reações químicas em volumes muito pequenos,

ii) como veículos para transporte de drogas e, recentemente, para transporte de genes,

iii) em biotecnologia, indústria farmacêutica (desenvolvimento de formulações antitumorais e vacinas baseadas em lipossomo) e em cosméticos (Schuber, F., 1998).

Os lipossomos podem ser planejados racionalmente, resultando em lipossomos não reativos (estericamente estabilizados) (SLs), bem como lipossomos polimórficos (catiônicos, fusogênicos). Os SLs podem ser planejados para exibir reatividade específica (direcionamento), enquanto lipossomos polimórficos podem exibir alta reatividade a ácidos nucleicos e membranas celulares. Devido a seu reduzido reconhecimento e ataque pelo sistema imunológico, estes lipossomos podem ter utilidade em quimioterapia de câncer. Os lipossomos polimórficos são promissores em terapia gênica devido à possibilidade da transfecção de DNA. Em paralelo, liberação mais eficiente e retenção de drogas dentro de lipossomos (baseado em acúmulo ativo através de gradientes iônicos) têm contribuído para utilização desta nova geração de lipossomos (Lasic, D.D. & Papahadjopoulos, D., 1995).

Lipossomos estericamente estabilizados foram criados quando se soube que estabilização mecânica ou eletrostática não poderiam formar lipossomos com suficiente estabilidade em um ambiente biológico como a circulação sistêmica. Por isso, em SLs, a bicamada lipídica contém glicolipídios ou mais recentemnte, lipídios conjugados com etilenoglicol que forma uma barreira estérica externa à membrana. SLs mantêm-se no sangue até 100 vezes mais tempo que lipossomos convencionais e podem, por isso, aumentar a eficácia farmacológica dos agentes encapsulados. Além disso, SLs permitem direcionar lipossomos para células específicas através de ligante, porque são muito menos susceptíveis a ataque não específico que os convencionais. SLs ligados a anticorpos ou outros ligantes são acumulados muito mais prontamente em células alvo que os lipossomos convencionais (Lasic, D.D. & Papahadjopoulos, D., 1995).

A melhoria na estabilidade biológica de SLs é devida à inibição das interações com proteínas do plasma (tais como opsoninas e lipoproteínas) e receptores de superfície celular através de barreira estérica sobre a bicamada (Lasic, D.D. & Papahadjopoulos, D., 1995).

Aplicação intravenosa de complexos DNA-lipossomos catiônicos tem sido realizada mas com modesto sucesso. Como causas disso, tem sido citada a formação de agregados grandes entre complexos e proteínas do plasma aniônico, levando à neutralização de carga catiônica e remoção rápida dos agregados do sistema reticuloendotelial e então, redução ou abolição da atividade de transfecção. Tanto que, resultados de alguns estudos sobre imunização com complexos SUV-DNA plasmidial indicam respostas imunes similares ou modestamente mais altas que aquelas obtidas com DNA sozinho (Gregoriadis, G. 1998b).

Existem técnicas que provocam profundas mudanças no comportamento farmacocinético das SL (lipossomos não reativos mas estericamente estabilizados). A meia vida dos lipossomos convencionais no sangue, após injeção intravenosa, por exemplo, pode variar entre 2 horas e mais de 40 horas em humanos. Foram descobertos lipossomos de circulação longa que são capturados mais lentamente por fígado e baço, sendo direcionados passivamente para sítios tumorais, aumentando a "biodisponibilidade" de drogas antitumorais. Por exemplo, em certos tumores foram encontrados níveis de lipossomos 25 vezes mais altos mesmo após vários dias da injeção. Uma outra conseqüência deste fenômeno é o uso de SL para imagens (Schuber, F., 1998).

O tumor sólido de carcinoma de cólon C26 em camundongos é praticamente insensível a tratamentos com doxorrubicina livre ou incorporada em lipossomos convencionais. Contudo, a administração de SLs contendo doxorrubicina (SL-Dox) resultou em completa remissão de tumores em tratamentos precoces e em melhorias significativas em tratamentos tardios. Em um modelo de tumor de carcinoma mamário em camundongos, SL-Dox foi bem mais eficiente que lipossomos convencionais e reduziu a incidência de metástases. SL-Dox pôde deter o crescimento de células tumorais de pulmão humano em severa imunodeficiência combinada (SCID) de camundongos, enquanto doses equivalentes de doxorrubicina livre ou encapsulada em lipossomos convencionais, não foram eficazes (Lasic, D.D. & Papahadjopoulos, D., 1995).

1.3 - Vesículas de anfifílicos

Desde sua introdução como compostos sintéticos formadores de bicamada (Fendler, J.H. 1980), dihexadecilfosfato de sódio (DHP) ou sais de dioctadecildimetilamônio (DODA) têm encontrado diferentes usos em áreas estratégicas (Carmona-Ribeiro, A.M., 1992). Em

particular, lipossomos catiônicos têm interagido com sucesso com superfícies negativamente carregadas tais como aquelas de células procarióticas (Martins et al., 1997) ou eucarióticas (Carmona-Ribeiro, A.M. et al., 1997), proteínas antigênicas negativamente carrregadas (Tsuruta, L.R. et al., 1997), ácidos nucleicos (Behr, 1993), polímeros sintéticos e látex (Carmona-Ribeiro, A.M. & Midmore, B.R., 1992a; Lessa, M.M. & Carmona-Ribeiro, A.M.,1996) e superfícies minerais (Rapuano, R. & Carmona-Ribeiro, A.M., 1997) (Carmona-Ribeiro, AM, 2000).

As propriedades físicas e funcionais de vesículas anfifílicas variam com o método de preparação. Três destes têm sido empregados para preparar dispersões de DODAC (cloreto de dioctadecildimetilamônio) e DHP em soluções aquosas: (1) sonicação em um banho ; (2) sonicação com um tip ; (3) vaporização clorofórmica. O segundo método produz vesículas unilamelares e/ou fragmentos de bicamada e o terceiro, vesículas unilamelares grandes. Com a exceção das vesículas unilamelares grandes obtidas por vaporização clorofórmica, as dispersões obtidas pelos outros dois métodos não estão ainda bem caracterizadas. Medidas de turbidez em função do tempo após preparação de vesícula em água revelaram que as dispersões obtidas por sonicação não eram estáveis em contraste com a estabilidade aparente de dias para a dispersão preparada por vaporização clorofórmica (Carmona-Ribeiro, AM., 1992).

Por outro lado, anfifílicos catiônicos de modo geral são reconhecidamente tóxicos tanto para células procarióticas como para as eucarióticas (Salt, W.G. & Wiseman, D., 1970). Tápias et al. caracterizaram o efeito bactericida de vesículas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) usando *Escherichia coli* como modelo (Tápias, G.N. et al., 1994; Sicchierolli, S. M. et al., 1995). Essa investigação foi estendida ao efeito do DODAB sobre a viabilidade de fibroblastos normais e transformados em cultura (Carmona-Ribeiro, A.M. et al., 1997). Após meia hora de interação com células eucarióticas em monocamada subconfluente, observou-se morte celular a partir de 0,1 mM de DODAB tanto para as células normais quanto para as transformadas (Carmona-Ribeiro, A.M. et al., 1997).

A Tabela 1.1 ilustra a citotoxicidade de lipossomos de DODAB contra células de mamífero e algumas bactérias ou fungos. Células de mamífero são mais resistentes a DODAB que bactérias ou fungos, sobrando 50% de viáveis em DODAB 1,0 mM enquanto, para os últimos, 50% de viabilidade ocorre na faixa micromolar de concentrações de DODAB. Cerca de 100% de células de mamífero mantêm-se vivas em concentrações de DODAB onde bactérias e fungos não sobrevivem. Lipossomos de DODAB também são passíveis de uso como bactericidas em conjunção com drogas (Carmona-Ribeiro, AM, 2000).

Tabela 1.1 - Citotoxicidade diferencial de lipossomos catiônicos de DODAB. Tempo de interação entre vesículas pequenas de DODAB e células foi fixado em 1 h. Adaptado de Carmona-Ribeiro, 2000.

Tipo de célula	Concentração inicial de células viáveis (células/mL)	Concentração de DODAB para 50% de sobreviventes (mM)
Fibroblastos de camundongo Balb-c 3T3 normais (clone A31)	10^4	1,000
Fibroblastos de camundongo SVT2 (SV40 transformados)	10^4	1,000
Candida. albicans	2×10^6	0,010
Escherichia coli	2×10^7	0,028
Salmonella typhimurium	2×10^7	0,010
Pseudomonas aeruginosa	3×10^7	0,005
Staphylococcus aureus	3×10^7	0,006

Os lipossomos catiônicos podem agir como agentes antimicrobianos, causando morte de bactérias e fungos em concentrações que mal afetam células de mamífero em cultura (Carmona-Ribeiro, AM, 2000).

O efeito bactericida do DODAB foi avaliado para uma concentração fixa de bactérias viáveis ($2,5 \times 10^7$ bactérias viáveis/mL) de *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, e *S. aureus*. A susceptibilidade frente ao DODAB aumentou de *E. coli* para *S. aureus* na ordem acima. A viabilidade celular diminiu para 5% com tempo de interação até 1 h em concentrações de DODAB iguais a 50 e 5 μM para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Na neutralização de carga da célula bacteriana, a floculação das bactérias por vesículas de DODAB foi mostrada ser um processo de difusão controlada. O efeito do tamanho de vesícula sobre viabilidade celular demonstrou que vesículas grandes, devido a sua constante de afinidade mais alta por bactéria com relação às vesículas pequenas, mataram *E. coli* em concentrações menores de DODAB. Para *E. coli* e *S. aureus*, a determinação simultânea de viabilidade celular e mobilidade eletroforética em função da concentração de DODAB mostra uma correlação muito boa entre carga da superfície celular e viabilidade celular. Células carregadas negativamente são 100% viáveis enquanto células carregadas positivamente não sobrevivem (Campanhã, M.T.N. et al., 1999, Campanhã, M.T.N., 2000).

O mecanismo de morte celular não envolve lise celular ou ruptura vesicular como avaliado por medidas de extravasamento celular de compostos fosforilados e por um ensaio de ruptura vesicular (Martins, L.M.S. et al., 1997). A membrana externa isolada de *E. coli* e vesículas pequenas catiônicas de DODAB interagem para dar um aumento na mobilidade eletroforética de *ghosts* em função de concentração de DODAB (Martins, L.M.S. et al., 1997). A carga de superfície para *ghosts* torna-se zero na faixa micromolar de concentrações de DODAB. Outros autores também mostraram que adesão vesicular à membrana externa das bactérias é certamente o primeiro passo da interação (Frezard, F. & Garnier-Suillerot, 1991).

A Tabela 1.2 mostra como os lipossomos catiônicos de DODAB são utilizados para carrear biomoléculas negativamente carregadas tais como proteínas ou o nucleotídeo, 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato. Os lipossomos catiônicos são usados como imunoadjuvantes para indução de um tipo de hipersensibilidade tardia como à proteína antigênica de *Mycobacterium leprae* com 18 kDa que provoca choque térmico. A incorporação da proteína nos lipossomos adjuvantes aumenta a resposta imunológica celular em cerca de 10 vezes (Tsuruta, L.R. et al., 1997). Junto com a atração eletrostática dirigindo a incorporação da proteína sobre os lipossomos, há também a atração hidrofóbica entre o lipossomo e a proteína que leva à grande incorporação em concentrações de sal altas. Albumina de soro bovino (BSA) e incorporação de anti-BSA sobre os lipossomos catiônicos são mais sensíveis à força iônica que a incorporação de hsp - 18 kDA de *M. leprae* (Tabela 1.2). A incorporação diminui substancialmente quando realizada em PBS invés de água (Tabela 1.2), mostrando a relativa importância de forças eletrostáticas versus forças hidrofóbicas determinando a incorporação de proteína no lipossomo. O nucleotídeo na Tabela 1.2 é um caso típico de partição de molécula cuja incorporação na bicamada catiônica requer atração eletrostática grande que ocorre em água pura (Carmona-Ribeiro, AM, 2000).

Tabela 1.2 - Incorporação (%) de uma variedade de biomoléculas sobre lipossomos catiônicos de DODAB. Reproduzido de Carmona-Ribeiro, A.M., 2000.

Tipo e concentração de lipossomos	Biomolécula	Meio	Incorporação (%)
DODAB LV/2,6 mM	hsp 18 kDa	água	94-100
	(*M. leprae*)	PBS	67-74
DODAB LV/4,0 mM	BSA	água	100
		PBS	32-35
	anti-BSA	água	96-98
		PBS	26-31
DODAB LV/0,5 mM	2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato	água	22-25
DODAB LV/0,5 mM		NaBr 5 mM	2-4

Bicamadas das dispersões de DODAC e DHP preparadas por sonicação ou por vaporização clorofórmica depositam sobre microesferas de poliestireno de carga oposta com constantes de adsorção alta . No máximo de adsorção, a área por molécula de anfifílico adsorvido, as propriedades eletrocinéticas, e os tamanhos medidos para partículas observadas são consistentes com deposição de bicamada. O processo de deposição é controlado não apenas por forças de interação entre as vesículas e a microesfera mas também por restrições de empacotamento dentro da bicamada. Vesículas que tendem a retornar ao estado lamelar, isto é, em um estado com raio de curvatura maior, têm uma alta afinidade por microesferas grandes depositando como bicamadas múltiplas, e uma afinidade baixa por microesferas menores, depositando como bicamadas simples (Carmona-Ribeiro, AM., 1992).

Vesículas fosfolipídicas unilamelares pequenas e microesferas de poliestireno interagem em solução aquosa para formar látex recoberto com fosfolipídios. Primeiro, a bicamada anexa-se ao látex e segundo, a atração hidrofóbica entre bicamada fosfolipídica e superfície de poliestireno hidrofóbica induz cobertura com uma monocamada fosfolipídica. Depois disso, a(s) bicamada(s) deposita(m)-se sobre a monocamada que cobre o látex. Estes resultados podem ser importantes para reconstituição de função de proteína, estudos sobre reconhecimento de superfície celular, e construção de kits imunológicos e biosensores (Carmona-Ribeiro, AM & Herrington, TM, 1993).

Vesículas de DODAC e DHP em solução são floculantes ou estabilizantes eficientes para dispersões de carga oposta. Em contraste com surfactantes de cadeia simples, elas são eficientes em concentração muito baixa (10-200 μM). Uma vantagem sobre surfactantes

com cadeias hidrocarbônicas curtas é o caráter irreversível da adsorção de bicamada com altas constantes de adsorção (Carmona-Ribeiro, AM., 1992).

1.4 - Lipossomos catiônicos e carreamento de genes

O planejamento de sistemas artificiais capazes de carrear genes para células é um campo de considerável interesse em biologia molecular e engenharia genética. Protocolos disponíveis para terapia gênica baseiam-se principalmente em vetores virais recombinantes de alta eficiência. O uso repetitivo ou em larga escala desses carreadores biológicos irá eventualmente gerar diversos problemas que poderiam ser evitados com o uso de vetores inertes. Entretanto, estes últimos, com raras exceções, têm-se revelado muito menos eficientes que os primeiros. Diversos tipos de moléculas catiônicas capazes de ligar DNA e transportá-lo até as células têm sido descritos (Behr, J.P., 1993, Yu, W. et al., 1999). Dentre essas moléculas estão polipeptídeos quiméricos e lipídios sintéticos.

Lipopoliaminas sintéticas (Behr, J.P. et al, 1989) foram utilizadas com sucesso em diversas transfecções não-virais (Loeffler, J.P. & Behr, J.P., 1993; Barthel, F. et al., 1993; Behr, J.P., 1994). Mesmo assim, a eficiência de transfecção obtida utilizando esses vetores é ainda ordens de magnitude inferior àquela obtida com os vetores biológicos. Recentemente, Behr e colaboradores sintetizaram diversos anfifílicos catiônicos com cadeias hidrocarbônicas duplas ou simples, curtas ou longas; todas, tendo em comum o caráter poliamínico de suas cabeças polares (Remy, J-S. et al., 1994). A seguir, compararam a eficiência de transfecção dessas moléculas com aquela do Transfectam (marca registrada que corresponde ao DOGS - dioctadecilamidoglicilespermina) chegando a definir um papel central para a cabeça poliamínica quanto a condensar o plasmídeo e ligá-lo à superfície celular (Remy, J-S. et al., 1994). Ainda, estabeleceram que poliaminas de cadeia única (que formam micelas em solução aquosa) não promovem transfecção (Remy, J-S. et al., 1994). A observação de fibroblastos 3T3 em cultura por microscopia de contraste de fase ao longo da transfecção revelou o aparecimento de numerosas partículas aderidas às células (Remy, J-S. et al., 1994). A poliamina interagiria com DNA condensando-o a ponto de formar uma partícula globular recoberta e carregada positivamente. O recobrimento com a poliamina protegeria a partícula de DNA a nível de compartimento endossomal de forma a haver eventualmente um acúmulo no núcleo da célula onde finalmente a partícula recoberta se descobriria "dissolvendo" seu recobrimento poliamínico em um oceano de DNA e recuperando sua conformação helicoidal (Remy, J-S. et al., 1994).

Friend et al. usando lipossomos catiônicos compostos por N-(1-2,3-dioleiloxipropil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA) e dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) complexados a DNA fizeram observações morfológicas da interação lipossomo/célula através de microscopia eletrônica, propondo que a principal rota de entrada de lipossomos catiônicos nas células seria por endocitose. Ocasionalmente, ocorreria fusão com o envelope nuclear e formação de membranas vesiculares intranucleares e reticulares (Friend, D.S. et al., 1996).

Vieweg et al. usaram plasmídeos complexados com lipossomos catiônicos para terapia gênica do câncer de próstata humano (Vieweg, J. et al., 1995). Foram feitos testes para averiguar viabilidade clínica de vacinas tumorais nas quais o tumor fôra geneticamente modificado. Usando o complexo plasmídeo/lipossomo catiônico foi possível a introdução e expressão do gene IL-2 na linhagem de células tumorais de rato e em culturas de células humanas (Vieweg, J. et al., 1995).

Mioblastos em cultura primária transfectados com 2 μg de plasmídio pRSV-luc complexado com 50 nmoles de lipossomos catiônicos (cloreto de N-(α-trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato/dilauroilfosfatidilcolina/dioleoilfosfatidiletanolamina; proporção molar de 1:2:2) expressaram a luciferase com alta eficiência sem citotoxicidade. Foi o primeiro caso de introdução de genes estrangeiros em culturas primárias de mioblastos através de lipossomos (Kojima, H. et al., 1995).

Jääskelainen et al. estudaram as interações oligonucleotídeo-lipossomo catiônico utilizando compostos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) em uma proporção molar de 8:15 ou uma formulação comercial DOTAP (N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamoniometilsulfato), em diferentes proporções. Concluíram que fosfatidiletanolamina ou carga negativa são requisitos na membrana celular para fusão dos complexos oligonucleotídeo-lipossomo catiônico com a membrana. A proporção oligonucleotídeo/lipídio catiônico resultou crítica na determinação de agregação ou fusão dos lipossomos catiônicos entre si induzida pelos oligonucleotídeos (Jääskelainen, I. et al., 1994).

Yaroslavov estudou a interação de lipossomos de fosfatidilcolina/cardiolipina com complexos DNA/brometo de cetilpiridínio ou DNA/brometo de poli(n-alquil-4-venilpiridínio), mostrando que o complexo é destruído ao interagir com o lipossomo uma vez que os policátions dissociam-se do complexo com o DNA para se associarem com os lipossomos (Yaroslavov, A.A. et al., 1996). Em outro estudo da interação complexo/lipossomo, Akao et al. estudaram a mudança conformacional do DNA induzida pelos lipídios catiônicos através de dicroismo circular (Akao, T. et al., 1996). Devido a essa mudança conformacional do

DNA, a fluorescência do brometo de etídio incorporado ao DNA se reduz. A conformação do DNA pôde ser controlada por seleção do lipídio e da temperatura (Akao, T. et al., 1996).

De um ponto de vista físico-químico, a interação entre DNA e lipídios ou surfactantes catiônicos pode ser vista como uma interação entre dois polieletrólitos de carga oposta dirigindo a formação de um complexo mantido à custa da formação de pares iônicos. Essa interação induz uma mudança conformacional nas moléculas de DNA caracterizada por alta cooperatividade (Hörer, O.L. & Enache, C., 1995; Ciccarone, V. et al., 1995). Recentemente, através de microscopia de fluorescência acoplada a uma câmera de vídeo, placa digitalizadora e processamento de imagem, foi possível observar a transição "bobina-glóbulo" em tempo real em uma única molécula longa de DNA como aquela do bacteriófago T4 (com várias centenas de kilobases e 55 μm de comprimento estendido). Essa transição foi induzida por 0,01 mM de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um anfifílico catiônico que forma micelas em solução aquosa (Mel'nikov, S. M. et al., 1995). Aumentando a concentração de anfifílico, observou-se formação de agregados com dois ou mais glóbulos (Mel'nikov, S. M. et al., 1995). Apesar desse avanço quanto a se desvendar alguns aspectos estruturais da interação, de modo geral, a caracterização físico-química da interação DNA/anfifílicos catiônicos ainda deixa muito a desejar. Particularmente importante é a caracterização do sistema DNA/lipossomos catiônicos dada a perspectiva de seu uso em transferência de genes.

Vários autores têm observado que os lipossomos catiônicos transfectam bem ácidos nucleicos em uma ampla variedade de células eucarióticas (Ciccarone, V. et al., 1995; Felgner, P.L. et al., 1987; Hawley-Nelson, P. et al., 1993, Sandri-Goldin, R.M. et al., 1983, Sternberg, b. et al., 1998, Tros de Ilarduya, C. & Düzgünes, N., 2000).

Anteriormente, Behr e colaboradores (Behr, J.P. et al., 1989) haviam descrito morte de células endócrinas do lobo intermediário da pituitária a partir de meia hora de interação entre células e complexos DODAC/DNA (onde DODAC é o cloreto de dioctadecildimetilamônio adicionado para se obter uma proporção de cargas positivas e negativas de 3:1). Atribuíram à morte celular a menor eficiência de transfecção obtida para os complexos DODAC/DNA em comparação com os complexos DOGS/DNA. A eficiência de transfecção cresceu com a relação *r* entre cargas positivas (no DODAC ou no DOGS) e negativas (no DNA) sendo praticamente igual à transfecção máxima a partir de *r* igual a 1. Assim, houve transfecção máxima a partir do ponto de neutralidade dos complexos (Behr, J.P. et al., 1989).

Propriedades físico-químicas têm um papel importante na interação entre vesículas lipídicas e membranas biológicas. Embora a transfecção gênica de plasmídeos

complexados com lipossomos catiônicos esteja sendo estudada extensivamente, pequena atenção parece estar sendo dada para entender suas características físico-químicas e mecanismos de aporte celular. Recentemente, Mahato et al. (1995) estudaram a expressão gênica de pCAT sozinho ou complexado com lipossomos catiônicos . Usaram Lipofectin e LipofectACE como modelos de carreadores catiônicos, por serem os lipossomos mais usados comercialmente. Após injeção intravenosa de [^{32}P]pCAT sozinho ou complexado com lipossomos catiônicos na proporção 1:5 w/w, a radioatividade foi eliminada do plasma e acumulada principalmente no fígado e nos pulmões. Ambas as amostras de complexo DNA/lipossomo mostraram expressão gênica *in vivo* no pulmão, coração, rim, e baço, mas não no fígado (Mahato, R.I. et al., 1995).

Existem preparações comerciais envolvendo lipídios catiônicos para transfecção de genes como a LipofectAMINE™ que é um reagente lipídico policatiônico que aumenta a freqüência e a atividade de transfecções de células eucarióticas. Este reagente é ativo em todos os tipos de células testados (COS-7, BHK-21, HeLa, CHO-K1), dando transfecções transientes até 90% e tem atividade maior de 2 a 30 vezes que compostos lipídicos monocatiônicos como Lipofectin®, LipofectACE™ e DOTAP em 6 dos oito tipos de células testados (BHK-21, HeLa, COS-7, CHO-K1, NIH 3T3 e células PC 12). Esta atividade maior pode ser devido à presença de um grupo carregado altamente positivo, a espermina no DOSPA (2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato), o componente catiônico do reagente LipofectAMINE™. O reagente LipofectAMINE™ é ativo em transfecções estáveis, dando 1% de colônias resistentes GENETICIN^{R} em células NIH 3T3 transfectadas. Otimização cuidadosa dos parâmetros de transfecção permite melhor controle de toxicidade (Hawley-Nelson, P. et al., 1993).

Vesículas unilamelares pequenas (SUV) normalmente formadas por DOPE e um lipídio catiônico, são conhecidas pela capacidade de complexar DNA na mistura (freqüentemente levando à formação de agregados de complexos vesícula-DNA) e transfectar células *in vitro*. Acredita-se que o caminho da transfecção comece com a ligação do complexo DNA e vesícula positivamente carregada às membranas celulares negativamente carregadas e endocitose. Isto é seguido de desestabilização da membrana endossomal onde através de difusão lateral de lipídios aniônicos da monocamada endossomal faceando o citoplasma, o DNA é deslocado do complexo e liberado para o citossol (Gregoriadis, G. 1998b).

1.5 - Estrutura de complexos lipídio catiônico:DNA

Eastman et al. (Eastman, S.J. et al., 1997) verificaram que ao interagir lipídios catiônicos com DNA, há rápida mudança de carga líquida do complexo formado, passando de negativa para positiva. Estes complexos são chamados de "lipoplexes" (Felgner, P.L. et al., 1987; Felgner, P.L., 1997; Lasic, D.D. et al., 1997; Hope, M.J. et al., 1998) e formam-se espontaneamente quando soluções aquosas contendo DNA e lipossomos catiônicos são misturadas. O tamanho do complexo é tipicamente da ordem de mícrons (Rädler, J.O. et al, 1997; Koltover, I. et al., 1998; Lasic, D.D. et al., 1997; Templeton, N.S. et al, 1997; Sternberg, B. et al. 1994; Tarahovsky, Y.S. et al., 1996; Huebner, S. et al., 1999; Boukhnikachvili, T. et al., 1997; Pitard, B. et al., 1999; Birchall, J.C. et al.,1999). Em geral, os lipossomos usados para formação deste complexo contêm ao menos 2 tipos de moléculas lipídicas. O componente chave são os lipídios catiônicos, que servem como agentes de condensação de fitas negativamente carregadas de DNA. Também são importantes os lipídios *helper* (HL), que têm papel crucial na determinação da estrutura dos complexos condensados. Eles também parecem afetar a eficiência de transfecção de DNA mas seus mecanismos de ação ainda não estão bem claros (Hui, S.W. et al., 1996; Zuidam, N.J. & Barenholz, Y., 1999, May, S. et al, 2000).

A geometria de equilíbrio preferida pelo lipídio-DNA condensado é determinada pela densidade superficial de carga e propriedades elásticas de seus constituintes lipídicos das bicamadas. Ambas as características dependem da natureza e composição da mistura lipídio catiônico/HL. DNA dupla fita, sendo uma molécula mais rígida (de comprimento mais longo, $l_P \approx 500$ Å para B-DNA), impõe sobre possíveis geometrias lipoplex porque retém sua estrutura essencialmente linear em todos os complexos. Em contraste, as camadas lipídicas são membranas auto-associadas "maleáveis" que podem adaptar suas estruturas para otimizar a geometria de complexação (May, S. et al, 2000).

Várias morfologias lipoplex têm sido propostas, correspondendo a diferentes misturas lipídicas. Algumas destas estruturas podem corresponder a intermediários metaestáveis, p. ex., agregados como espaguete que consistem de uma (possivelmemte super enrolada) dupla fita de DNA envolvida por bicamada lipídio catiônico/HL (Sternberg, B. et al., 1994; May, S. & Bem-Shaul, A. 1997) (Vide Figura 1.2).

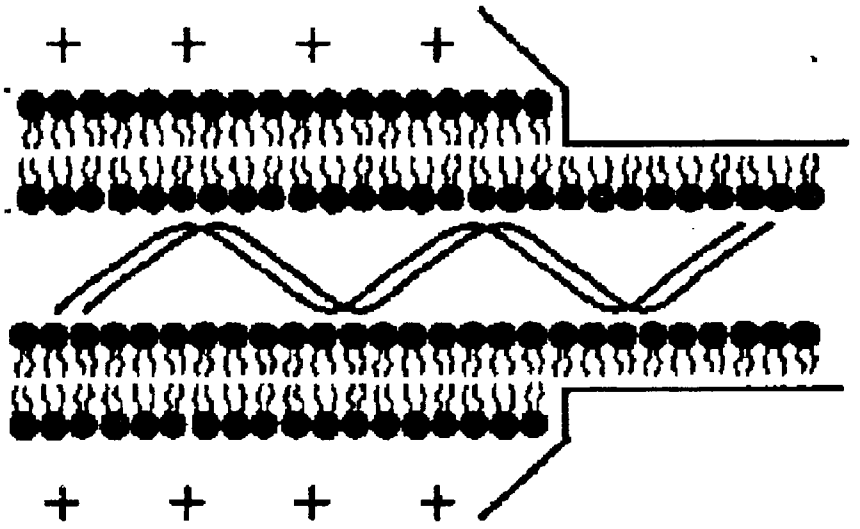


Figura 1.2 - Modelo de "espaguete". DNA dupla fita coberta por bicamada. (Adaptado de Sternberg, B. et al., 1994).

Duas simetrias condensadas têm sido identificadas como fases de equilíbrio ordenadas, são os agregados lamelar L_{α}^{C} e hexagonal H_{II}^{C} (conforme Figura 1.3, S e H, respectivamente), cujas características estrutural e termodinâmica têm sido determinadas por medidas de difração de raios x e medidas complementares (Rädler,J.O. et al, 1997; Salditt, T. et al, 1997; Koltover, J. et al., 1998; Lasic, D.D. et al., 1997; Templeton,N.S. et al., 1997; Tarahovsky, Y.S. et al, 1996; Huebner, S. et al., 1999; Boukhnikachvili, T. et al., 1997; Pitard, B. et al., 1999; May, S. et al, 2000).

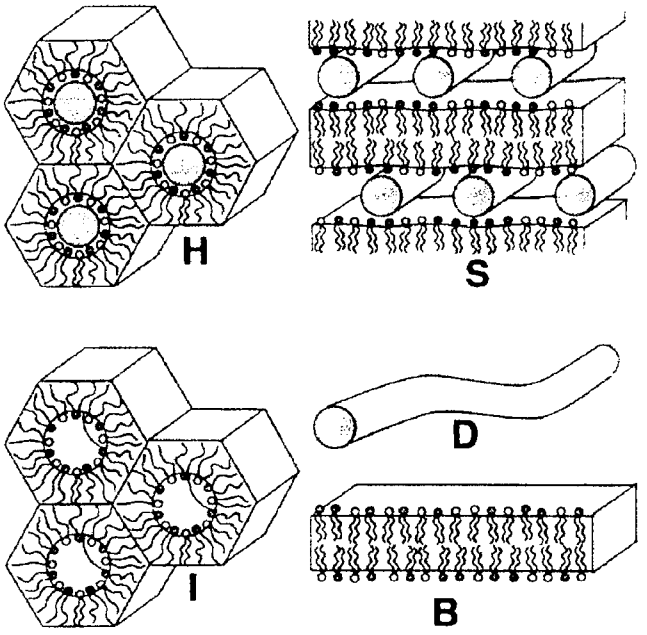


Figura 1.3 - Esquema das 5 fases de complexos vesícula-DNA. As fases denotadas **H** e **S** são as estruturas do complexo H_{II}^{C} e L_{α}^{C}, respectivamente. Os símbolos **I** e **B** marcam as fases H_{II} e L_{α}, respectivamente. **D** representa DNA não complexado. As regiões sombreadas correspondem à secção transversal do DNA. As camadas lipídicas são misturas de lipídios catiônicos e lipídios não carregados (*helper*). (Reproduzido de May, S. et al, 2000).

A fase L_{α}^{C} (ou "*sanduíche*") (Figura 1.3S) é um arranjo de bicamadas lipídicas empilhadas com monocamadas de DNA intercaladas dentro de camadas de água. As fitas de DNA dentro de cada galeria são paralelas umas a outras, exibindo uma distância repetida definida $\underline{d}$. Embora $\underline{d}$ dependa das proporções de concentração lipídio catiônico/DNA e lipídio catiônico/HL, o espaço entre duas monocamadas lipídicas é próximo e constante a $l \approx 26$ Å, correspondendo ao diâmetro de uma dupla fita B-DNA (≈ 20 Å) rodeada por uma fina camada de hidratação. A fase L_{α}^{C} é estabilizada por atração eletrostática entre o DNA negativamente carregado e a bicamada lipídica catiônica. Sem DNA, a fase lipídica lamelar (L_{α}) (Figura 1.3B) é instável devido à forte repulsão eletrostática entre as bicamadas carregadas (May, S. et al, 2000).

Similarmente, a estrutura de H_{II}^{C} (Figura 1.3H), ou "favo de mel" (May, S. & Bem-Shaul, A, 1997), pode ser considerada como uma fase lipídica hexagonal inversa ordinária (H_{II}) (Figura 1.3I) com fitas de DNA intercaladas dentro de seus tubos de água.

Aqui também, o diâmetro dos tubos de água é apenas ligeiramente maior que o diâmetro das fitas de DNA. A presença de DNA é crucial para estabilizar a estrutura hexagonal. Sem ela, repulsões eletrostáticas fortes dirigirão os lipídios para se organizarem em bicamadas planares (May, S. et al, 2000).

As diferenças estruturais entre as fases L_α^C e H_{II}^C implicam diferenças significativas entre energias eletrostáticas (de carga) e as energias elásticas lipídicas destas 2 geometrias. Na fase H_{II}^C, cada molécula de DNA está cercada por uma monocamada lipídica fortemente (negativamente) curvada, de raio $R \approx 13$ Å (Koltover, I. et al., 1998). Esta geometria cilindricamente concêntrica proporciona eficiente neutralização das cargas de DNA através de cargas superficiais catiônicas, especialmente no ponto isoelétrico, onde a carga catiônica total balanceia exatamente a carga de DNA total (May, S. & Bem-Shaul, A., 1997) e os complexos hexagonais são previstos serem mais estáveis que aqueles lamelares. Deve-se notar, contudo, que lipídios carregados geralmente preferem a geometria de bicamada planar, invés da geometria hexagonal inversa que é preferida por (alguns) lipídios neutros. Por isso, espera-se que a estabilidade de complexos H_{II}^C dependa sensivelmente da composição lipídica (May, S. et al, 2000).

O lipídio catiônico DOTAP é caracterizado por uma curvatura espontânea muito pequena. Usando vesículas compostas de DOTAP como lipídio catiônico e DOPE como *helper*, encontrou-se que a geometria de agregação preferida é a fase H_{II}^C. Em contraste, usando DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) como lipídio *helper*, ocorreu a formação de complexos L_α^C. Isto é consistente com o fato que DOPE puro se auto organiza em uma fase H_{II}, isto é, a curvatura espontânea deste lipídio é negativa, enquanto moléculas de DOPC preferem a formação de bicamadas planares. Sabe-se que adição de álcoois de cadeia curta nas misturas, possibilita reduzir a rigidez da ordem de uma magnitude (Safinya, C.R. et al., 1989; Szleifer, I. et al., 1988). Realmente, a adição de hexanol ao sistema DOTAP/DOPC-DNA resulta em uma clara transição de fase, de 1ª ordem, $L_\alpha^C \rightarrow H_{II}^C$ (Koltover, I. et al., 1998; May, S. et al, 2000).

Moléculas grandes de DNA exibem discreta mudança conformacional entre os estados de bobina e glóbulo com adição de uma quantidade muito pequena (com a ordem de 10^{-5} M) de surfactante catiônico, como por exemplo, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Mel'nikov et al. (1995) usaram microscopia de fluorescênica para observação simples da molécula de T4 DNA dupla fita em um ambiente aquoso. Quando a concentração de CTAB é menor que $9{,}4 \times 10^{-6}$ M, todas as moléculas de DNA exibem o estado de bobina estendida. Quando a concentração de CTAB é maior que $2{,}0 \times 10^{-5}$ M, apenas moléculas de DNA compactadas no estado globular são observadas. Na região entre estas duas

concentrações críticas, os estados bobina e glóbulo coexistem na solução. Ocorre um pequeno aumento no tamanho do glóbulo de DNA na concentração de CTAB mais alta que 10^{-3} M, devido à entrada de moléculas de CTAB no glóbulo de DNA. A formação de agregados de dois ou mais glóbulos é observado nas concentrações de surfactante altas acima de 1,6 x 10^{-4} M. Abaixo desta concentração, os glóbulos não coalescem para um agregado (Mel'nikov, S.M. et al., 1995).

A interação entre T4 DNA e lipossomos de DODAB/DOPE também foi estudada com o uso de uma técnica de microscopia de fluorescência. Foi observado que a interação começou em concentrações baixas de lipossomos. A distribuição do tamanho de DNA foi bimodal em uma ampla faixa de concentrações de lipossomo. A concentração crítica do lipídio catiônico necessária para o completo colapso das moléculas simples de DNA dependeu fortemente da composição dos lipossomos da mistura de DODAB/DOPE. O efeito é devido à concorrência entre a formação do complexo DNA-DODAB e incorporação de DODAB em lipossomos misturados com DOPE (Mel'nikov, S.M. et al., 1998).

Microscopia eletrônica de transmissão criogênica (crio-TEM) de complexos de DNA com mistura de lipossomos, revelou que o empacotamento lamelar de moléculas de lipídio foi típico para os complexos formados por misturas de lipídio enriquecido cationicamente, enquanto arranjos hexagonais foram encontrados para complexos lipídicos enriquecidos por lipídios neutros (Gustafsson, J. et al., 1995). As microestruturas dos complexos foram também examinadas com o uso da técnica de espalhamento de raios X de pequeno ângulo ou difração de raios X de baixo ângulo (SAXS - *small-angle X-ray scattering*), que confirmou os resultados obtidos por microscopia crio-TEM e caracterização quantitativa de empacotamento lipídico nos complexos com macromolécula de DNA. Também encontraram que a introdução do lipídio neutro nos complexos entre DNA e lipídios de carga oposta, DODAB e DOTAP, moderadamente aumentaram a estabilidade térmica dos complexos e mudaram as características quantitativas dos perfis de fusão dos complexos (Mel'nikova, Y.S. et al., 1999).

Para aplicações *in vitro*, lipoplexes são normalmente formados em excesso de carga positiva (catiônico:nucleotídeo), e os complexos resultantes são aplicados em células (Felgner, P.L. et al, 1987, Felgner, J.H. et al., 1994; Gao, X. & Huang, L. 1991). Para aplicações *in vivo*, lipoplexes formados em excesso positivo e excesso negativo de relações de carga têm sido usados para transferência gênica (Gao, X. & Huang, L., 1995). Apesar deste amplo uso em biologia, o fator mais crítico determinando atividade de transfecção por lipoplex não está claro (Xu, Y. et al., 1999).

Gershon e colaboradores foram os primeiros a estudar a interação entre lipossomos DOTMA/DOPE e as estruturas originadas (Gershon, H. et al., 1993). Eles sugeriram que lipossomos catiônicos ligam-se ao DNA e formam estruturas compactas de vesículas agregadas sobre o DNA. Quando a relação de carga (±) atinge 1:1, as membranas dos lipossomos compactados fundem-se. Isto resulta em mistura de lipídios de lipossomos adjacente e simultâneo colapso do DNA para uma estrutura condensada. O processo é altamente cooperativo e foi sugerido levar à encapsulação de DNA em uma membrana de bicamada. Micrografias eletrônicas de complexos lipídio catiônico com metal/DNA revelaram estruturas finas que estavam dentro dos lipossomos em uma correlação de carga de 1:1. A hipótese de fusão de membrana estava consistente com estudos relatando fusão entre lipossomos catiônicos mediada por vários poliânions (Düzgünes, N. et al., 1989; Keren-Zur, M. et al., 1989) ou com estudos com lipossomo aniônico e células (Stamatatos, L. et al., 1988; Leventis, R. & Silvius, J.R., 1990). Estes e outros estudos reforçam a hipótese que a inclusão de lipídios fusogênicos tais como DOPE no lipoplex é crítico para a atividade de transfecção (Felgner, J.H. et al., 1994; Farhood, H. et al., 1995) (Xu, Y. et al., 1999).

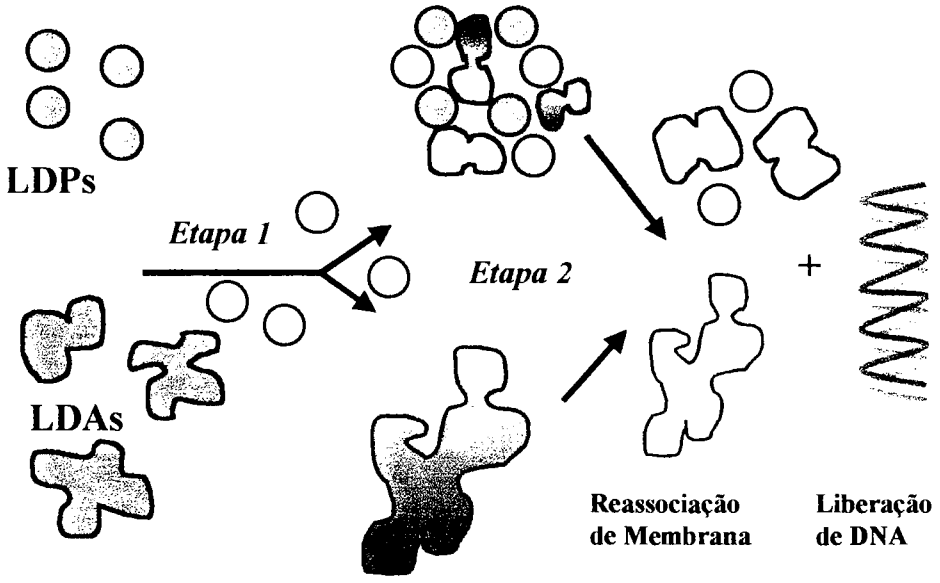
Xu et al. (1999) encontraram 2 diferentes estruturas de empacotamento lipídio/DNA: uma encontrada em excesso de carga positiva e outra, em excesso negativo. Os lipoplexes podiam ser separados por sedimentação em gradiente de sacarose e foi observado que tinham diâmetro de partícula pequeno e os lipoplexes com um potencial zeta positivo diferiam na estrutura daqueles com potencial zeta negativo quando vistos por microscopia crioeletrônica. O complexo positivamente carregado era esférico e continha um condensado interior não distingüível. Em contrapartida, os lipoplexes negativamente carregados tinham um aspecto periódico interno proeminente 5,9 ± 0,1 nm com material projetando-se como lanças da estrutura esférica (Xu, Y. et al., 1999). Além disso, ambos os complexos, negativo e positivo, eram ativos em transfecção. Estes lipoplexes eram resistentes ao efeito inibitório do soro em transfecção *in vitro* (Xu, Y. et al., 1999).

Lipoplexes constituídos de lipossomos de DOTAP e DNA plasmidial foram preparados em várias proporções de carga (grupo catiônico : fosfato de nucleotídeo), e o componente excedente foi separado do lipoplex. Xu et al. mediram a estequiometria do lipoplex, notaram suas propriedades coloidais, e observaram sua morfologia e estrutura por microscopia eletrônica. As propriedades coloidais dos lipoplexes foram determinadas principalmente pela relação de carga lipídio catiônico/DNA e não dependeram da composição lipídica (Xu, Y. et al., 1999).

Zuidam & Barenholz (1999) observaram que os lipossomos contendo DOTAP ficavam instáveis com a diluição. Esta instabilidade foi representada pelo aumento contínuo

de tamanho de lipoplexes em função do tempo. A mistura de lipossomos catiônicos e DNA foi nas proporções molares DNA/lipídio catiônico entre 0,2 e 0,8. Adição de lipossomos catiônicos compostos de 100% DOTAP ou DOTAP/DOPE (1/1), induziu transição instantânea dos DNA plasmidiais da conformação B- para uma conformação parcial tipo C. Em certas condições como desidratação parcial do DNA, esta poderia ser encontrada na forma Ψ e caracterizada por interação entre hélices paralelas. A lipofecção mais alta foi obtida sob condições de instabilidade do lipoplex (Zuidam, N.J. & Barenholz, Y., 1999).

Harvie et al. (1998) formaram complexos entre DNA e lipídios constituídos por DODAC/DOPC ou DODAC/DOPE (proporção molar 1:1) e depois adicionaram lipossomos aniônicos a estes complexos, verificando rápida desestabilização da membrana, dissociação do complexo e entrega de DNA (Vide Figura 1.4). Constataram também que esta desestabilização não dependia da incorporação de DOPE (Harvie, P. et al., 1998).



Etapa 1 – **Adição de membrana aniônica**
Etapa 2 – **Contato, desidratação, defeitos de empacotamento, transferência/troca de lipídio, fusão**

Figura 1.4 - Esquema do processo de dissociação mediado por membrana aniônica sobre partículas de lipídio-DNA (LDPs) ou agregados de lipossomo/DNA (LDA). (Adaptado de Harvie, P. et al., 1998).

Os lipoplexes são complexos que podem ser caracterizados por vários parâmetros físico-químicos, incluindo distribuição de tamanho, forma, estado físico (lamelar, tipo hexagonal II e/ou outras fases), sinal e magnitude do potencial elétrico de superfície , e nível

de hidratação da interface lipídio-DNA. Somente após todas estas variáveis serem caracterizadas é que os lipoplexes poderiam ser melhor compreendidos sob o aspecto da eficiência de transfecção. De todos estes parâmetros fisico-químicos, a hidratação foi a mais negligenciada, mas foi o foco do estudo realizado por Hirsch-Lerner, D. & Barenholz, Y. (1999).

Eles sugeriram que a desidratação ocorre durante formação de lipoplexes e isto deve ser o pré-requisito para contato íntimo entre lipídios catiônicos e DNA. Lipossomos catiônicos compostos (L+) de DOTAP sem e com lipídios *helper* (DOPC, DOPE, ou colesterol) ou de DC-Chol/DOPE foram complexados com pDNA (S16 hormônio de crescimento humano) em várias proporções de carga DNA-/L+ (0,1-3,2). Os níveis de hidratação dos diferentes lipossomos catiônicos e DNA separadamente foram comparados com os níveis de hidratação dos lipoplexes. Lipossomos DC-Chol/DOPE foram os 'mais secos' de todas as composições lipossomais. Entre lipossomos catiônicos baseados em DOTAP, a ordem das composições de 'mais seca' para 'mais molhada' foi DOTAP/colesterol > DOTAP/DOPE > DOTAP/DOPC > DOTAP. Lipoplexes DOTAP/DOPE com proporção de carga 0,44 tiveram 16,5% de desidratação e com proporção de carga 1,5, 46,4% de desidratação. Para lipoplexes DOTAP/Chol com estas proporções de carga, havia 17,9% e 49% de desidratação, respectivamente (Hirsch-Lerner, D. & Barenholz, Y., 1999).

Kennedy et al. (2000) consideraram que as diferenças nos lipoplexes dependem do seu modo de formação, do método de preparação e manipulação de força iônica. Eles fizeram um monitoramento dos efeitos térmicos, tamanho de partícula, ruptura vesicular e mistura lipídica. Verificaram que quando vesículas de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EDOPC), um reagente de transfecção fosfolipídico catiônico novelar, foram tituladas com DNA em força iônica fisiológica, o tamanho das partículas aumentava, vesículas se rompiam, e lipídios de membrana se misturavam quando a quantidade de DNA era adicionada até a proporção de carga 1,6:1 (+:-). Esta proporção de carga também correspondeu ao ponto final calorimétrico quando nenhuma variação de calor era detectada. Em contraste, quando lipídio foi adicionado ao DNA, vesículas permaneceram separadas e intactas até uma proporção de carga de 1:1 (+:-) ser excedida. Sob tais condições, o ponto final calorimétrico foi 3:1 (+:-) (Kennedy, M. T. et al., 2000). (Vide Figura 1.5).

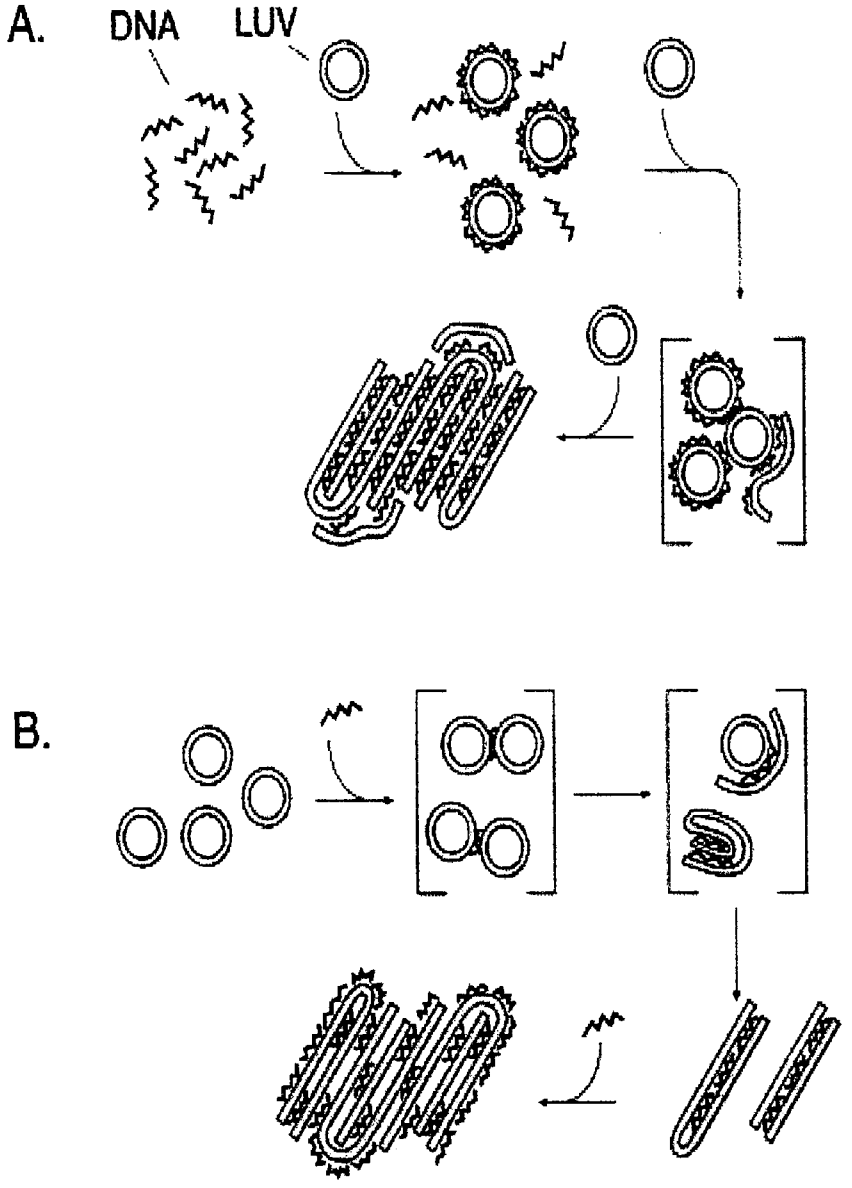


Figura 1.5 - Mecanismos propostos para a formação de complexos EDOPC:DNA. (A) Formação do complexo DNA-lipídio catiônico por titulação de DNA com lipídio (DNA inicialmente em excesso). DNA cobre uniformemente a superfície de vesículas EDOPC - sem suas rupturas - quando elas estão na solução de DNA. Após suficiente lipídio ter sido adicionado e todos os DNAs em solução terem sido ligados, vesículas adicionadas ligam-se a vesículas previamente cobertas com DNA, levando a, inicialmente, compactação de algumas vesículas cobertas de DNA cercando vesículas adicionadas. Devido ao *stress* anisotrópico gerado por adesão vesícula-vesícula, estas pequenas compactações são metaestáveis (colchetes) e rompem-se. Subseqüente adição de vesículas, com associação de extremidades de bicamada livres, leva ao crescimento das partículas. Quando lipídio suficiente é adicionado para cobrir as superfícies dos complexos em suspensão com lipídio, o ponto final é atingido e qualquer lipídio adicionado simplesmente coexiste com complexos. Deve-se notar que as proporções de lipídio e DNA têm sido alteradas de alguma maneira. As vesículas têm 100 nm de diâmetro, e o DNA é um círculo de 900 nm (diâmetro) na forma de uma superbobina flexível. LUV, vesícula unilamelar grande. (B) Formação do complexo DNA-lipídio catiônico

por titulação de lipídio com DNA (lipídio inicialmente em excesso). Embora inicialmente DNA possa encontrar uma vesícula simples, subseqüentes encontros com vesículas sozinhas levam à dimerização (talvez algumas trimerizações) em que DNA se associa na interface das 2 vesículas. Adesão vesícula-DNA-vesícula gera *stress* assimétrico, que leva à ruptura de pelo menos uma vesícula (colchetes indicam estados metaestáveis). DNA adicional, ao longo de associações extremidade-extremidade de vesículas previamente rompidas, leva à agregação contínua e crescimento do complexo. Após todos os lipídios terem-se associado em complexos, DNA adicional cobre a superfície externa e impede mais agregação. Isto representa o ponto final calorimétrico. Subseqüentemente, DNA adicionado permanece livre em solução. O processo difere daquele mostrado para quando força iônica é mais baixa (NaCl não adicionado), em que a interação DNA-vesícula é forte o suficiente para levar à ruptura vesicular com contato da vesícula com uma molécula de DNA. Além disso, agregação ocorre mais lentamente que em força iônica alta porque o DNA interage muito com uma vesícula, não duas, por causa das forças repulsivas vesícula-vesícula maiores. Agregação começa apenas quando a superfície externa do resíduo de uma vesícula rompida ter sido essencialmente neutralizada por DNA (Kennedy, M. T. et al., 2000).

1.6 - Fatores que influenciam a transfecção gênica

Freqüentemente o fosfolipídio DOPE é incluído em formulações (Farhood, H. et al., 1995, Mitrakos, P. & Macdonald, P.M., 2000) para melhorar a eficiência de transfecção. Acredita-se que isto se deva à preferência de DOPE assumir uma arquitetura hexagonal invertida H_{II} a de uma arquitetura lamelar L_{α}, desestabilizando a membrana e permitindo liberar DNA para o citossol (Farhood, H. et al., 1995, Mitrakos, P. & Macdonald, P.M., 2000).

Após injeção intravenosa dos lipossomos multilamelares, a velocidade de depuração dos lipossomos pelas células fagocíticas do fígado e baço e sua eventual degradação intracelular dependem da composição lipídica vesicular e do conteúdo de colesterol (Patel, H.M. et al., 1983, Dave, J. & Patel, H.M., 1986, Dersksen, J.T.P. et al., 1988, Roerdink, F.H. et al., 1989, Patel, H.M., 1992, Semple, S.C. et al., 1996). Colesterol pode intensificar o empacotamento de fosfolipídios com temperatura de transição baixa e assim, solidificar a membrana lipossomal (Senior et al., 1985, Gregoriadis, 1994). Tais mudanças podem diminuir o ataque por lipoproteína de alta densidade e desintegração do lipossomo (Scherphof, G. et al., 1978, Tall, A.R. et al., 1986), minimizando a susceptibilidade da interface lipídica a perturbações (Moghimi, S.M., 1998).

Segundo Mitrakos & Macdonald (2000), quanto maior a cadeia de nucleotídeos, maior a dificuldade de pareamento com anfifílicos catiônicos e portanto, menor a eficiência de incorporação em vesículas, com menor eficiência de transfecção gênica (Mitrakos, P. & Macdonald, P.M., 2000).

Porém, segundo Ross & Hui (1999), quanto maior o tamanho do lipoplex, maior a eficiência de transfecção. Lipoplexes grandes, especialmente feitos de vesículas multilamelares não sofrem efeito de inibição pelo soro (Ross, P.C. & Hui, S.W., 1999).

Prefere-se transfecções em presença de soro para possibilitar melhores condições de sobrevivência de alguns tipos de células, função celular e diminuição dos efeitos citotóxicos (Ciccarone, V. et al., 1993). Contudo, muitas vezes, o soro dificulta a formação de lipoplexes e a interação com macromoléculas dos sistemas biológicos (como sangue e tecidos) (Simões, S. et al., 2000).

Para contornar esta situação, albumina de soro humano (HSA - *human serum albumin*) cobrindo lipossomos catiônicos tem gerado complexos com atividade de transfecção (Simões, S. et al., 2000). Quando albumina do soro bovino (BSA - *bovine serum albumin*) e antialbumina do soro bovino (anti-BSA) foram incorporados em lipossomos de DODAB em água ou PBS, mostraram preservar a carga e integridade dos lipossomos, fatores importantes na estabilidade biológica dos complexos de DODAB e biomoléculas (DNA inclusive) *in vivo* (Carvalho, L.A. & Carmona-Ribeiro, A.M., 1998).

Lam & Cullis (2000) mostraram para diferentes linhagens de células e diferentes formulações de lipídio catiônico que cálcio (Ca^{2+}) aumenta de 3 a 20 vezes, a potência de transfecção *in vitro* dos complexos DNA plasmidial-lipossomo catiônico e que este efeito pode ser inibido pela presença de EDTA (Lam, A.M.I. & Cullis, P.R., 2000).

Li, S. et al. (1998) mostraram que lipossomos ao serem misturados com protamina antes de adicionar DNA plasmidial ficavam estáveis por mais tempo, dando níveis de expressão gênica mais altos enquanto You et al. (1999) também examinaram a melhoria na transfecção, utilizando DODAB e adição de protamina à solução de DNA plasmidial antes da formação dos complexos DNA/vesícula catiônica. Protaminas parecem proteger DNA da degradação por DNase e promover a entrega de DNA ao núcleo (You, J. et al, 1999).

2 - OBJETIVOS

Analisar sob o ponto de vista físico-químico, as interações entre DNA e lipossomos catiônicos de DODAB. Para isso, foram realizados os seguintes itens:

- Avaliação da adsorção de nucleotídeo DMP às vesículas grandes de DODAB e da relação molar DODAB/nucleotídeo para adsorção máxima.

- Determinação do efeito da presença de sal monovalente sobre a formação do complexo DODAB/nucleotídeo.

- Determinação da mobilidade eletroforética das vesículas grandes em função da concentração de DMP nas misturas de interação em diferentes concentrações de DODAB.

- Determinação da mobilidade eletroforética de partículas em misturas de DNA e vesículas pequenas de DODAB.

- Avaliação da adsorção de vesículas de DODAB aos DNAs de bacteriófagos T2, T4, T5, T7 e λ.

- Avaliação da ruptura vesicular causada pela interação DODAB-nucleotídeo e DODAB-DNA.

- Obtenção da cinética de floculação de lipossomos de DODAB induzida pelo DMP.

- Avaliação do deslocamento de um cromóforo marcador de membrana (merocianina 540) ou de um marcador fluorescente (DAPI) de DNA devido à interação DNA/membrana catiônica.

- Avaliação da transição "bobina-glóbulo" causada pelo DODAB sobre DNAs.

- Avalialção do efeito do DODAB sobre curvas de fusão de DNA dupla fita.

- Avaliação do tamanho dos glóbulos formados pela interação DODAB-DNA.

- Transformação de bactérias de *E. coli* sensível ao antibiótico Ampicilina para uma forma resistente, utilizando vesículas de DODAB para carrear plasmídeo contendo genes para resistência a este antibiótico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Reagentes

Brometo de dimetildioctadecilamônio (DODAB), marca Sigma, código D-2779, lote 34H7709, 99,9% de pureza e usado sem purificação adicional

Água ultrapura, grau MilliQ

Clorofórmio p.a., marca Merck

Ácido perclórico p.a., marca QM

Solução de molibdato de amônio 1,25 %

Solução de ácido ascórbico 5%

Solução padrão de fosfato de sódio (NaH_2PO_4) 1 mM

Solução de brometo de sódio (NaBr) 5 mM

Solução de nitrato de mercúrio 10 mM fatorada

Solução indicadora de difenilcarbazona em etanol

Soluções de cloreto de sódio (NaCl)

Solução tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 6,5

D-Glicose p.a., marca Merck

2,5-difeniloxazol (PPO) para medições de cintilação, marca Merck

[2,2'-p-fenileno-bis(5-feniloxazol)] (POPOP) para medições de cintilação, marca Merck

Tolueno p.a., marca Synth

Triton X-100 - detergente não iônico, marca Union Carbide

[^{14}C]Sacarose radioativa - NEC-100X, Lote 2849-067, 24,8 GBq/mmol (671,0 mCi/mol); 37,0 mBq (1,0 mCi), 10,0 mL de etanol:água, 9:1, marca Du Pont NEN Product

Sal dissódico do ácido etilenodiamino tetra acético p.a. (EDTA), marca Synth

Cloreto de cálcio p.a, marca Merck

Reagente Brij 35, marca Aldrich-Chemie

Corante Orange G, marca Aldrich-Chemie

Merocianina 540 (MC) - marcador de membrana lipídica, procedência: Molecular Probes

Marcador fluorescente cloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) - da Molecular Probes

2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato (d-AMP) de sódio - Nucleotídeo "*DMP*", marca Sigma, 99% de pureza

DNA do Colifago T4, marca Sigma, cód. D-6176

DNA do fago Lambda, marca Sigma, cód. D-0144

Liofilizados de DNA de bacteriófago dupla fita T2, T5 e T7 - isolados de *E. coli*, marca Sigma e utilizados sem outras purificações

Plasmídeo pSV-β Galactosidase, marca Promega

Ampicilina sódica, pó para injetável, concentração de 100 mg/mL quando reconstituído, procedência FURP

Meios de cultura:

Tryptic Soy Broth (TSB), marca Oxoid

Tryptic Soy Agar (TSA), marca Oxoid

Mueller-Hinton Agar (MH), marca Biobrás

3.1.2 - Materiais diversos

Membrana de celulose para diálise, marca Sigma

Membranas filtrantes de policarbonato, porosidade de 0,4 μM, marca Millipore

Microseringas

Placas de Petri, diâmetro 90 mm

3.1.3 - Equipamentos

Centrífuga Eppendorf, modelo 5402 da Scientific Instruments

Espectrofotômetro Ciba Corning, modelo 2800, com controle de temperatura

Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2000, duplo feixe

Sonicador Lab-Line Ultra Tip Labsonic Systems

Centrífuga refrigerada Himac modelo SCR 20B da Hitachi, com velocidade de rotação entre 0 a 20000 rpm e temperatura entre –10 a 40 °C

Banho-maria, da Precision Scientific, modelo 182

Rank Brothers Mark II Microelectrophoresis Apparatus

Agitador magnético

Hemicâmara de diálise de equilíbrio

Cintilador: Tri-CARB 1600 TR-Liquid Scintillation Analyzer, marca Packard

Espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500

Termômetro marca Jencons, modelo 2300

Contador de colônias manual, modelo C-6000, marca Phoenix

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparação das vesículas de DODAB

3.2.1.1 - Por sonicação

DODAB foi pesado analiticamente, transferido para um béquer e água foi adicionada o suficiente para obtenção da concentração desejada. Este preparado foi submetido a uma sonicação no equipamento Lab-Line Ultra Tip por 10 minutos, com sonda de um "*cell disrupter virsonic - model 150*" e operado a 90 W nominais, e temperaturas entre 50 e 70 °C (Carmona-Ribeiro, A.M., 1992; Carmona-Ribeiro, A.M & Chaimovich, H., 1983), isto é, acima da temperatura de transição de fase da bicamada de DODAB que foi recentemente determinada como sendo 43,5 °C em água (Nascimento, D.B. et al., 1998). Em seguida, DODAB foi centrifugado por 1 hora a 14.000 rpm (ou 15.000 g), utilizando equipamento Himac para precipitar partículas de titânio e multilamelas (Fendler, J.H., 1980; Mortara, R.A et al., 1978), que se formam por esta técnica, além de se obter vesículas unilamelares pequenas (SUV - *small unilamellar vesicles*) e/ou fragmentos de bicamada com diâmetro médio de cerca de 86 nm (Carmona-Ribeiro, A.M. & Midmore, B.R., 1992a).

Após cada preparação, foi confirmado o teor de DODAB, através da microtitulação (Schales, O. & Schales, S.S., 1941) com nitrato de mercúrio em que o princípio do método consiste em dosear o contraíon brometo do DODAB, utilizando difenilcarbazona como solução indicadora.

3.2.1.2 - Por aquecimento – método do SNIPPE*

DODAB foi pesado analiticamente e transferido para um frasco, adicionando-se quantidade suficiente de água para obtenção da concentração desejada e deixado em banho-maria a 56 °C (Katz, D. et al., 1995; Tsuruta, L.R. et al., 1997) por 30 minutos. A dispersão foi homogeneizada por simples agitação.

Foi feita dosagem da dispersão por titulação com nitrato de mercúrio e difenilcarbazona como indicador (Schales, O. & Schales, S.S., 1941).

3.2.1.3 - Por vaporização clorofórmica*

Foi preparada uma solução clorofórmica de DODAB com concentração 10 vezes maior que a desejada. Lentamente, foi injetado o volume de 1 mL desta solução em 10 mL de água mantida a 70 °C e sob borbulhamento de nitrogênio (Carmona-Ribeiro, AM. & Chaimovich, H., 1983). DODAB foi doseado pela microtitulação com nitrato de mercúrio (Schales, O. & Schales, S.S., 1941).

*Ambos os métodos originam vesículas unilamelares grandes, com diâmetro médio de cerca de 400 nm, que foram obtidas por medições de eficiência de incorporação (Tsuruta, LR. et al., 1997; Carvalho, L.A. & Carmona-Ribeiro, A.M., 1998) e cerca de 345-711 nm dependendo da força iônica (0-5 mM de sal monovalente) (Carmona-Ribeiro, A.M. & Midmore, B.R., 1992a; Nascimento, D.B. et al., 1998). Os diâmetros foram obtidos usando técnica de espalhamento de luz.

3.2.2 - Determinação da adsorção de nucleotídeo DMP em lipossomos de DODAB

$C_{10}H_{14}N_5O_6P$ (peso molecular para ácido livre : 331,2)
$C_{10}H_{12}N_5O_6PNa_2.(4H_2O)$ (peso molecular para sal sódico : 447)

DMP

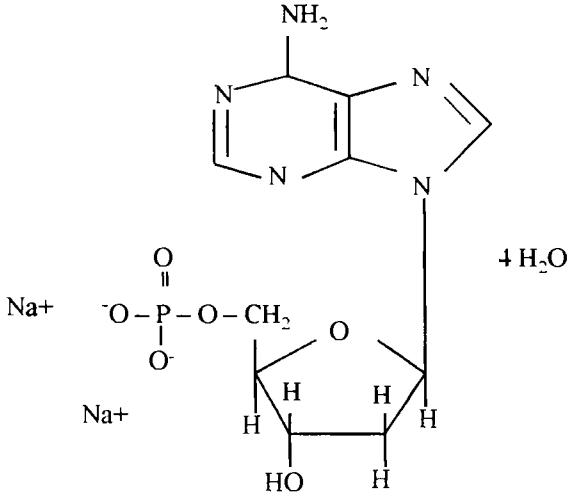


Figura 3.1 - Estrutura química de 2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato de sódio (DMP)

A interação DMP/lipossomo foi promovida pela mistura de 0,5 mL de uma dispersão de DODAB 1,0 mM com 0,5 mL de uma solução de DMP com concentrações variando de 0 a 2,0 mM. A mistura foi incubada (30 min a 37 °C) e centrifugada (15.000 g por 1 h a 4 °C) para separar os lipossomos do DMP livre em solução. O sobrenadante foi filtrado através de membranas de policarbonato (0,4 μm de porosidade) e a retenção do lipossomo pelas membranas de filtração foi avaliada pela determinação de turbidez em 400 nm no filtrado. Rotineiramente, vesículas grandes ficam retidas pelo filtro e turbidez igual ou muito próxima de zero é obtida. A adsorção de DMP nos lipossomos foi obtida pela determinação de fosfato (Rouser, G. et al., 1970) nas soluções filtradas onde lipossomos estavam completamente ausentes. Com DODAB 0,5 mM, a concentração de DMP adsorvida (em milimoles por litro) é plotada como uma função de concentração final de DMP na mistura (em milimoles por litro). A adsorção máxima foi obtida pelo platô na curva (Kikuchi, I.S. et al., 1999) ou pela linearização das isotermas de adsorção de acordo com o modelo de Langmuir (Jackson, S. et al., 1986). A linearização das isotermas de adsorção permitiu determinar uma constante de afinidade K (M^{-1}), e adsorção máxima, $(x/m)_{max}$ (concentração molar de DMP adsorvido/1 M de DODAB na adsorção máxima) (Jackson, S. et al., 1986). O efeito de NaBr 5 mM na formação do complexo DODAB/DMP foi avaliado através das isotermas de adsorção de DMP obtidas como descrito anteriormente porém para misturas em solução de NaBr 5 mM.

Ao analisar as misturas DMP-DODAB, foram preparados controles para estudar um eventual aumento na adsorção de nucleotídeo quando vesículas eram preparadas em solução de DMP e assim, com oferta de DMP também para o compartimento interno da vesícula.

Lipossomos de DODAB 0,5 mM foram preparados por ambos os métodos (por aquecimento ou por vaporização clorofórmica) em soluções de DMP 0,8 mM (excesso de DMP) e antes de determinar a proporção molar DODAB:DMP, foram incubados por 30 minutos em duas diferentes temperaturas: uma acima e outra abaixo da temperatura de transição de fase. Todos os controles foram feitos em quadruplicata para cada método de preparação de vesículas e cada temperatura de incubação e as proporções molares foram obtidas, resultando iguais àquelas obtidas para misturas de vesículas previamente preparadas em água e adicionadas à solução de DMP.

3.2.3 - Obtenção das isotermas de adsorção de DMP sobre vesículas de DODAB

Foi preparada uma solução aquosa 2 mM de nucleotídeo DMP a e a partir desta, foram preparadas misturas DMP/DODAB com concentrações finais crescentes de nucleotídeo DMP, conforme Tabela 3.1. Em seguida, em todos os tubos tipo Eppendorf foram adicionados volumes de 0,5 mL de dispersão de DODAB 1,0 mM. As misturas foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Tabela 3.1 – Esquema para obtenção de uma isoterma de adsorção de DMP sobre vesículas de DODAB. Em cada tubo, foi adicionado 0,5 mL de dispersão de DODAB 1,0 mM para manter a concentração final de DODAB em 0,5 mM.

Volume da solução de nucleotídeo DMP 2 mM (μL)*	Volume de água (μL)	Concentração final de nucleotídeo na mistura DODAB-nucleotídeo (mM)
0	500	0
50	450	0,100
75	425	0,150
100	400	0,200
125	375	0,250
150	350	0,300
175	325	0,350
200	300	0,400
225	275	0,450
250	250	0,500
275	225	0,550
300	200	0,600
350	150	0,700
375	125	0,750
400	100	0,800
450	50	0,900
475	25	0,950
500	0	1,000

*A concentração do nucleotídeo foi corrigida após seu doseamento pelo método do fosfato.

Utilizando a centrífuga Eppendorf, as misturas foram centrifugadas a 14.000 rpm (ou 15.000 g) por 1 hora a 4 °C e em seguida, foram filtradas por membranas de policarbonato de 0,40 μm de porosidade. A limpidez de cada filtrado foi controlada através de leituras de

turbidez em 400 nm, utilizando água como branco. Se apresentassem turbidez acima de cerca de 0,014, fazia-se uma refiltração, utilizando membranas com porosidade de 0,20 μm. Isto garantia que não havia no filtrado vesículas contribuindo para aumentar turbidez.

Conforme mostra a Tabela 3.2, o processo de filtração de misturas vesícula/DMP usando filtro com poros de 0,40 μm foi eficiente para eliminar vesículas no filtrado. Exceto para a amostra 10 que foi submetida a uma nova filtração, desta vez, por filtro com porosidade de 0,20 μm.

Tabela 3.2 - Controle dos filtrados obtidos após passagem da mistura vesícula*/DMP por membrana de policarbonato, porosidade de 0,40 μm

Amostras	Turbidez (400 nm)
água (branco)	0
1	0,005
2	0,002
3	0,003
4	0,002
5	0,001
6	0,002
7	0,002
8	0,002
9	0,002
10	0,026**
11	0,005
12	0,003
13	0,004
14	0,005
15	0,004
16	0,004
17	0,006
18	0,005

*Vesículas obtidas por aquecimento
**Após estas leituras, a amostra foi submetida a outra filtração através de membrana com porosidade de 0,20 μm.

De cada filtrado, foram transferidas alíquotas de 50 e 100 μL para tubos de vidro que foram levados para evaporação em estufa à temperatura de 80-100 °C. Após evaporação, foi adicionado em cada tubo, 0,30 mL de ácido perclórico concentrado. Os tubos foram cobertos com bolas de vidro para evitar evaporação e deixados em digestor a 180 °C por 2

horas. Também foram submetidas ao mesmo tratamento desde a evaporação, as soluções padrões de fosfato (incluindo o ponto zero como controle): 0-10-30-50-70-90-100 μL de solução padrão de fosfato de 1 mM em água.

Após atingirem temperatura ambiente, foram adicionados em cada tubo, em seqüência 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25% e agitados. Em seguida, foi adicionado 0,4 mL de ácido ascórbico 5% e agitado para homogeneizar. Todos os tubos foram fechados com bolas de vidro e colocados em banho-maria fervente por 5 minutos.

Leituras de absorbância foram realizadas em 795-797 nm contra ponto zero da curva padrão de fosfato. A partir da concentração de DMP no filtrado e da concentração de DMP adicionada, foi calculada a concentração adsorvida. O gráfico da concentração adsorvida em função da concentração adicionada é a isoterma de adsorção.

Na Tabela 3.3 são apresentadas as concentrações de fosfato e as respectivas leituras espectrofotométricas para construção da curva padrão de fosfato da Figura 3.2.

Tabela 3.3 - Curva padrão de fosfato

Fosfato de sódio (nmolar)	Absorbância (795 nm)
0	0
10	0,097
30	0,338
50	0,514
70	0,732
90	0,920
100	1,048

Neste caso, através da curva padrão de fosfato, obteve-se a equação da reta $y=0,00351+0,01036x$, onde

x = teor de fosfato (nmolar)

y = leitura de absorbância da amostra

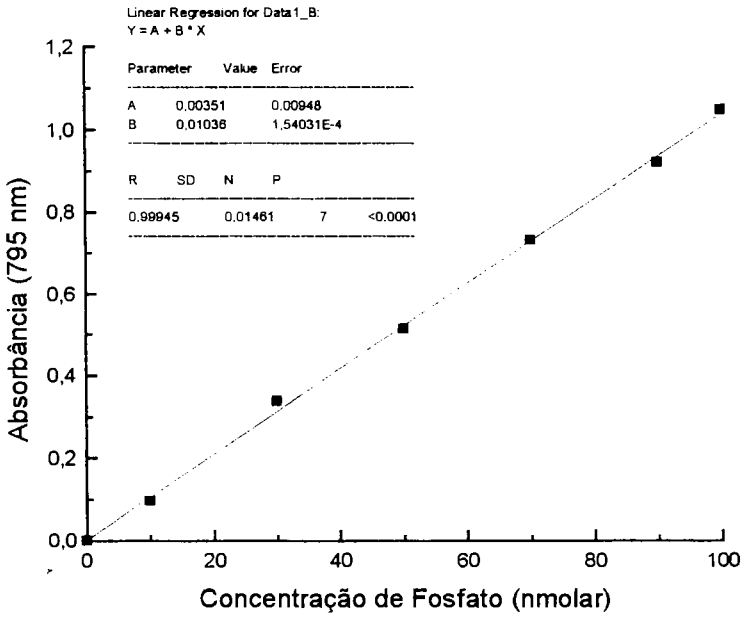


Figura 3.2 - Curva padrão de fosfato

Pelo teor de fosfato, determinou-se a concentração de DMP no filtrado ($C_{sobrenadante}$) e sabendo-se o teor adicionado ($C_{adicionada}$), chegou-se à concentração adsorvida ($C_{adsorvida}$)de nucleotídeo aos lipossomos :

$$C_{adsorvida} = C_{adicionada} - C_{sobrenadante} \quad \text{(em Molar)} \qquad \textbf{(equação 3.3.1)}$$

A Tabela 3.4a ilustra a determinação de DMP no filtrado para obtenção de uma isoterma de adsorção de DMP em vesículas grandes de DODAB (obtidas por aquecimento). A Tabela 3.4b, por sua vez, ilustra a determinação da concentração de DMP na solução-mãe através do mesmo processo de determinação de fosfato.

Tabela 3.4a - Determinação de nucleotídeo adsorvido em vesículas grandes de DODAB pelo método de doseamento do fosfato, com concentração final de DODAB na mistura de 0,50 mM

Absorbância (795 nm)	Fosfato (nmol)	C_1filtrado (mM)	$C_{média}$filtrado* (mM)	$C_{adicionado}$ (mM)	$C_{adsorvido}$ (mM)
0	0,128	0,002	0,001	0	0
0,012	1,155	0,023	0,021	0,103	0,082
0,03	2,696	0,053	0,053	0,155	0,102
0,052	4,580	0,091	0,091	0,206	0,115
0,069	6,036	0,120	0,120	0,258	0,138
0,092	8,005	0,160	0,157	0,309	0,152
0,133	11,515	0,230	0,230	0,361	0,131
0,156	13,484	0,269	0,264	0,412	0,148
0,182	15,710	0,314	0,311	0,464	0,153
0,219	18,878	0,377	0,378	0,515	0,137
0,234	20,162	0,403	0,391	0,567	0,176
0,26	22,388	0,447	0,435	0,618	0,183
0,307	26,412	0,528	0,517	0,721	0,204
0,338	29,066	0,581	0,569	0,773	0,204
0,378	32,491	0,649	0,644	0,824	0,180
0,437	37,542	0,750	0,742	0,927	0,183
0,441	37,885	0,757	0,754	0,979	0,225
0,477	40,967	0,819	0,811	1,03	0,219

*concentração obtida da média de pelo menos 2 determinações de fosfato num mesmo filtrado.
C_1filtrado - concentração obtida numa das 2 determinações de fosfato num mesmo filtrado.

Tabela 3.4b - Determinação da concentração de nucleotídeo na solução-mãe de DMP pelo método do fosfato

Volume da amostra (µL)	Absorbância	Fosfato (nmolar)	[nucleotídeo] (mM)
25	0,593	56,900	2,276
50	1,156	111,244	2,224
		média:	2,250

3.2.4 - Determinação da concentração de nucleotídeo DMP adsorvido sobre vesículas de DODAB

Foram realizadas determinações de nucleotídeo DMP adsorvido em diferentes situações:

- em preparações aquosas de vesículas obtidas por aquecimento ou por vaporização clorofórmica
- em preparações de vesículas de DODAB em água e preparações em diluente contendo nucleotídeo
- em interações lipossomo-nucleotídeo a temperaturas de 30, 44 e 56 °C (abaixo e acima da temperatura de transição de fase : 43,6 °C)

Foram utilizadas concentrações de DODAB e de nucleotídeo correspondentes ao platô da isoterma de adsorção dos experimentos anteriores para ter um excesso de nucleotídeo e garantir que todas as vesículas estivessem saturadas. A concentração de DODAB foi de 0,500 mM e a de DMP foi 0,800 mM na mistura final.

Cada tipo de preparação foi submetido a interações em temperaturas de 30, 44 e 56 °C por 30 minutos para verificar a possibilidade da entrada de nucleotídeo na vesícula na temperatura de transição de fase da bicamada e acima desta.

O excesso de nucleotídeo no sobrenadante foi obtido através de dosagem do fosfato, permitindo determinar o nível de nucleotídeo adsorvido na vesícula de DODAB.

3.2.5 - Linearização das isotermas de adsorção de DMP pelo modelo de Langmuir

Foram determinadas novas isotermas de adsorção de DMP sobre as vesículas de DODAB e estas foram linearizadas pelo modelo de Langmuir (Jackson, S. et al., 1986).

Exemplo de linearização:

$$\frac{c}{(x/m)} = \frac{c}{(x/m)_{max}} + \frac{1}{k(x/m)_{max}}$$

(equação 3.2.5.1)

Onde:

(x/m) = número de moles de DMP adsorvido/número de moles de DODAB

$(x/m)_{max}$ = limite de adsorção

m = número de moles de DODAB (em Molar)

c = concentração de DMP no sobrenadante (em Molar)

k = constante de adsorção ($Molar^{-1}$)

Se comparado a uma equação de reta: Y = *aX* + *b*, teríamos:

X correspondendo a c

a correspondendo a $1/(x/m)_{max}$

Y correspondendo a c/(x/m)

b = intercepto = $1/k(x/m)_{max}$

3.2.6 - Determinação do efeito de NaBr sobre a adsorção de nucleotídeo às vesículas de DODAB

Tanto as vesículas de DODAB como o nucleotídeo foram preparados em solução de brometo de sódio 5 mM e obtida nova isoterma de adsorção de DMP sobre as vesículas.

Para doseamento de DODAB não foi possível utilizar a técnica da microtitulação com nitrato de mercúrio porque se baseava na determinação do contraíon brometo e aqui, seriam determinados também os íons brometo provenientes do NaBr. Assim, a determinação de DODAB foi realizada pelo método do Brij (Stelmo, M. et al., 1987). O método baseia-se na formação de complexos estáveis entre o corante Orange G e íons de dioctadecildimetilamônio que podem ser solubilizados em soluções aquosas contendo micelas neutras de Brij 35. As variações na absorbância devido à formação do complexo na presença de Brij 35 foram usadas por Stelmo et al. para desenvolver este método para

análise quantitativa de anfifílico de cadeia longa de alquilamônios, baseado na diminuição de leituras de absorbância do complexo colorido ao interagir com as micelas de Brij.

A solução de Brij foi preparada da seguinte maneira:

0,0271 g de Orange G,

0,0718 g de Brij 35,

5,844 g de NaCl

água o suficiente para completar 1 litro de solução.

O método do Brij consiste na obtenção da curva padrão de DODAB através de uma dispersão já padronizada do mesmo anfifílico, por exemplo, dispersão de DODAB 0,5 mM. A partir desta dispersão, foram tomadas alíquotas de 0 a 100 μL, variando de 10 μL cada ponto.

Da amostra a ser analisada, foram tomadas alíquotas de 25, 50, 75 e 100 μL.

Foram adicionados 2 mL de solução de Brij em cada alíquota de padrão ou amostra e foram deixados em banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Depois, foram transferidos para banho-maria de 35 °C e após estabilização da temperatura, os padrões e as amostras que interagiram com a solução de Brij foram submetidas às leituras de absorbância a 480 nm no espectrofotômetro Ciba-Corning com controle de temperatura e estabilizado em 35 °C para este experimento. Como branco foi utilizada solução de NaCl 0,1 M.

Exemplo de doseamento de DODAB pelo método do Brij:

Tabela 3.5 - Leituras e correção de leituras de absorbância pelo método do Brij para curva padrão de DODAB

Volume V da dispersão de DODAB padrão a 0,5 mM (μL)	Absorbância (a 480 nm)	Abs corrigida (=Abs x (V x 0,001 + 2)/2)	(Abs_{BRANCO} – $Abs_{CORRIGIDA}$)	Concentração de Padrão de DODAB (mM)
10	1,034	1,039	0,011	0,0054
20	1,024	0,034	0,016	0,0108
30	1,011	0,026	0,024	0,0162
40	0,994	0,014	0,036	0,0216
50	0,976	1,000	0,050	0,0270
60	0,965	0,994	0,056	0,0324
70	0,952	0,985	0,065	0,0378
80	0,942	0,980	0,070	0,0432
90	0,925	0,967	0,083	0,0486
100	0,919	0,965	0,085	0,0540

*Abs – Absorbância; Absorbância do Branco foi 1,050.

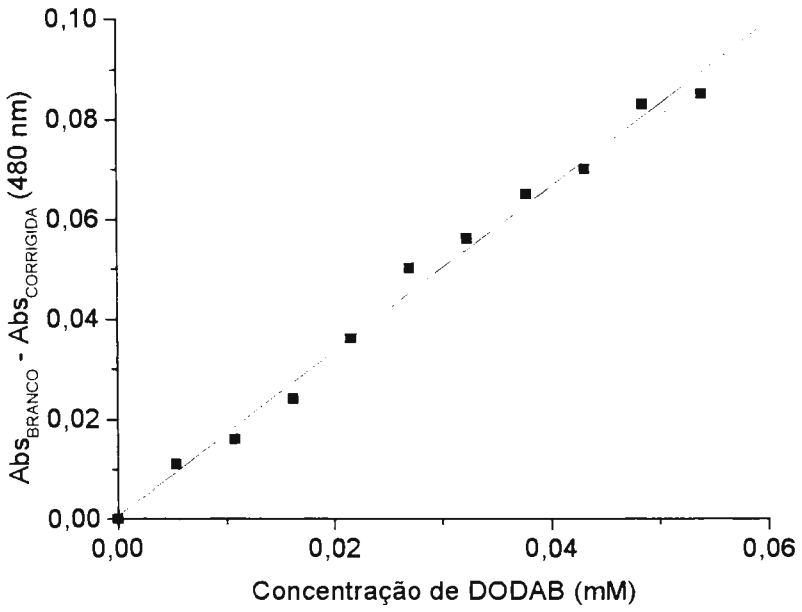


Figura 3.4 - Curva padrão de DODAB obtida pelo método do Brij

Pela interpolação na curva padrão ou pela equação da reta, foi obtida a concentração em cada tubo (Conc_tubo):

Conc_tubo = $((Abs_{BRANCO} - Abs_{CORRIGIDA}) - 0{,}0007)/1{,}64516$

Tabela 3.6 - Doseamento da dispersão de vesículas de DODAB obtidas por aquecimento em presença de NaBr 5 mM. Leituras e correção de leituras de absorbância pelo método do Brij.

Volume da dispersão de DODAB (V) (μL)	Absorbância (480 nm)	Absorbância corrigida (=Abs x (V x 0,001 + 2)/2)	(Abs_{BRANCO} – $Abs_{CORRIGIDA}$)	Conc_tubo (mM)	Concentração de DODAB (mM)
50	1,004	1,029	0,021	0,0123	0,491
50	1,006	1,031	0,019	0,0110	0,441
100	0,956	1,004	0,046	0,0277	0,553
100	0,961	1,009	0,041	0,0245	0,489
				Média :	0,494

Obs.: Concentração de DODAB (mM) = (Conc_tubo x 2000)/V

3.2.7 - Determinação do efeito de D-Glicose nas interações DODAB-nucleotídeo

Foram preparadas novas dispersões de DODAB (1 mM) e solução de nucleotídeo (2 mM) em presença de 0,264 M de D-Glicose e realizadas novas determinações de nucleotídeo adsorvido em vesículas de DODAB pelo método do fosfato.

3.2.8 - Determinação do efeito de NaCl sobre a estabilidade de vesículas de DODAB

O experimento visou à avaliação da floculação de lipossomos induzida por NaCl. Os lipossomos de DODAB foram preparados (por aquecimento) em solução de D-Glicose 0,511 M com osmolaridade de 0,522 Os/kg para evitar o rompimento dos lipossomos que poderia ocorrer por causa da mistura com soluções hiperosmóticas de NaCl sendo adicionadas aos lipossomos preparados em água. Todas as soluções de NaCl adicionadas aos liposomos induziram floculação e estavam isoosmóticas com o compartimento interno aquoso.

As soluções isoosmóticas contendo NaCl e D-Glicose em diferentes proporções permitiram aumentar a concentração de NaCl sem mudança de osmolaridade total da solução adicionada aos lipossomos. Para comparar floculação de lipossomos induzida por DMP e por NaCl, respectivamente, foram obtidos dados cinéticos para floculação induzida por NaCl em que a turbidez em 400 nm foi registrada em uma escala de tempo de dias porque a floculação foi muito mais lenta que aquelas induzida por DMP.

Assim, foram preparadas soluções isoosmóticas, com níveis crescentes de NaCl de acordo com a Tabela 3.7. A osmolaridade foi mantida com auxílio da solução de glicose. Foi fixado o nível de 0,552 Os/kg nas misturas, correspondente ao nível da solução de NaCl 0,250 M (maior concentração testada no experimento).

As vesículas de DODAB ou o complexo DODAB/nucleotídeo foram preparados em soluções de D-Glicose 0,511 M. Soluções isoosmóticas mistas de NaCl e D-Glicose foram então adicionadas às vesículas ou ao complexo para estudo da floculação das vesículas ou floculação do complexo induzido por sal.

Tabela 3.7 – Esquema para preparação de soluções isoosmóticas mistas contendo NaCl e D-Glicose

NaCl na mistura final (M)	(1) solução de NaCl (M)	(2) solução de D-Glicose (M)	Osmolaridade da solução (1) (Os/kg)	Osmolaridade da solução (2) (Os/kg)
0	0	0,511	0	0,552
0,010	0,012	0,491	0,023	0,529
0,030	0,036	0,450	0,069	0,483
0,050	0,060	0,411	0,113	0,439
0,075	0,090	0,369	0,168	0,384
0,100	0,120	0,312	0,224	0,328
0,115	0,138	0,281	0,258	0,294
0,130	0,156	0,253	0,289	0,263
0,145	0,174	0,221	0,323	0,229
0,160	0,192	0,191	0,356	0,196
0,175	0,210	0,158	0,388	0,164
0,190	0,228	0,127	0,421	0,131
0,205	0,246	0,096	0,454	0,098
0,220	0,264	0,064	0,487	0,065
0,235	0,282	0,043	0,510	0,042
0,250	0,300	0	0,552	0

- Faixa de salinidade fisiológica Obs.: Osmolaridade das misturas = 0,552 Os/kg

Foram preparadas misturas contendo 1 mL de solução isoosmótica mista e 0,2 mL de dispersão de vesícula. Cada mistura foi homogeneizada rapidamente e a leitura em 400 nm foi imediata (à temperatura ambiente) em espectrofotômetro Hitachi U-2000 para poder determinar a velocidade inicial de agregação.

Foram determinadas as maiores velocidades nos 10 minutos iniciais para cada concentração de NaCl. Como as velocidades iniciais foram muito baixas, aumentou-se o tempo de observação para 30 minutos (1800 segundos). Foram realizadas leituras finais de turbidez 24 horas e 1 semana após a homogeneização das misturas.

3.2.9 - Determinação de cinética de floculação de lipossomos de DODAB induzida pelo DMP

Com a finalidade de averiguar o poder floculante do nucleotídeo DMP sobre os lipossomos, foram realizados experimentos de determinação de turbidez em função do tempo após adição de DMP.

Foram obtidas cinéticas de floculação dos lipossomos (vesículas obtidas por aquecimento ou por vaporização clorofórmica) induzida por adição de solução aquosa de DMP, variando a concentração deste último. Para três diferentes concentrações de DODAB (0,5 – 0,25 e 0,08 mM), a concentração de DMP foi variada entre 0,1 e 1,8 mM. Turbidez da mistura em comprimento de onda de 400 nm foi registrada ao longo do tempo, durante 30 minutos, utilizando-se espectrofotômetro Hitachi.

3.2.10 - Determinação de mobilidade eletroforética (ME) dos lipossomos em presença de DMP

Dispersões de DODAB em água obtidas como previamente descritas (itens 3.2.1.2 e 3.2.1.3) foram diluídas para obter dispersões de DODAB 0,10 , 0,20 e 0,40 mM, misturados v/v com soluções de DMP com concentrações de nucleotídeo variando de 0 a 1,0 mM, e incubados (1 hora a 37 °C) antes de realizar medidas de mobilidade eletroforética (ME) como uma função da concentração de DODAB nas misturas. As mobilidades foram medidas usando um aparelho de microeletroforese Rank Brothers com uma cela chata e a 25 °C. A amostra a ser medida foi colocada dentro da cela de eletroforese, os eletrodos conectados e uma voltagem de ±60 V foi aplicada através da cela. As velocidades de vesículas individuais para uma dada distância de percurso (60 μm) foram registradas como também a direção de movimento das vesículas. As velocidades médias foram calculadas de dados de pelo menos 10 vesículas individuais. A mobilidade eletroforética foi calculada de acordo com a equação 3.2.10.1:

$$ME = \left(\frac{d'}{\Delta V}\right) x \frac{d}{t}$$

(equação 3.2.10.1)

Onde:

ME – mobilidade eletroforética (em $cm^2.\mu V^{-1}.s^{-1}$)

d' – distância inter-eletrodos = 6,606 cm

d- distância percorrida pela partícula (em μm) = 60 μm

t – tempo (em segundos) necessário para uma vesícula percorrer a distância d

ΔV – diferença de potencial aplicado (em volts) = ± 60 V

A uma dada concentração de DODAB, ME foi determinada como uma função de concentração de DMP.

Foram preparadas uma dispersão aquosa de DODAB 0,10 mM e uma solução aquosa de nucleotídeo DMP 0,20 mM e foram transferidas concentrações crescentes de nucleotídeo para um tubo de ensaio com tampa, conforme Tabela 3.8 e completados os volumes para 4 mL em cada tubo, utilizando água. Ainda, foram adicionados 4,0 mL de dispersão de DODAB 0,10 mM em todos os tubos e colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Tabela 3.8 – Esquema para obtenção de uma curva de mobilidade eletroforética das vesículas de DODAB em função da concentração do nucleotídeo DMP

Volume da solução de nucleotídeo 0,20 mM * (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final de nucleotídeo na mistura DODAB-nucleotídeo (mM)
0	4,0	0
0,2	3,8	0,005
0,4	3,6	0,010
0,6	3,4	0,015
0,8	3,2	0,020
1,0	3,0	0,025
1,2	2,8	0,030
1,6	2,4	0,040
2,0	2,0	0,050
2,4	1,6	0,060
2,8	1,2	0,070
3,2	0,8	0,080
4,0	0	1,000

*Para obtenção na mistura final DODAB-nucleotídeo de concentrações de nucleotídeo 2 e 4 vezes maiores, foi substituída a solução-mãe de nucleotídeo para 0,40 e 0,80 mM, respectivamente, mantendo-se o volume de água adicionado e concentração da dispersão de DODAB 0,10 mM.

Para as leituras, foi utilizado o equipamento de Rank Brothers Mark II Microelectrophoresis Apparatus, aplicando voltagens de -60 ou +60 V sucessivamente para cada partícula, à temperatura de 25 °C e no nível estacionário (NE) determinado pela seguinte fórmula:

$$NE = (d \times 1{,}333 \times 0{,}194) + di_1 \qquad \textbf{(equação 3.2.10.2)}$$

Onde:

NE – posição do nível estacionário

d – distância entre as 2 paredes internas da cela do aparelho (cm)

di_1 – posição da 1ª parede interna

1,333 – índice de refração do sistema

0,194 – constante da cela chata

Para cada mistura, a velocidade eletroforética foi determinada para, pelo menos, 20 partículas e determinada uma média para 10 melhores medições e Mobilidade Eletroforética (ME) calculada segundo a equação 3.2.10.1.

Tabela 3.9 - Exemplo de cálculo de mobilidade eletroforética (ME) para concentração de 0,05 mM do nucleotídeo DMP e de 0,05 mM de DODAB na mistura para percurso de 60 μm e aplicação de ±60 V de diferença de potencial.

partícula nº	t_e (s)*	t_d (s)**	$1/t_e$ (s^{-1})	$1/t_d$ (s^{-1})
1	2,46	2,43	0,41	0,41
2	2,27	2,24	0,44	0,45
3	2,14	2,21	0,47	0,45
4	2,06	2,09	0,48	0,48
5	2,18	2,20	0,46	0,45
6	2,26	2,39	0,44	0,42
7	2,29	2,22	0,44	0,45
8	2,35	2,49	0,42	0,40
9	2,19	2,40	0,46	0,42
10	2,34	2,38	0,43	0,42
		médias:	0,45	0,44
		ME*** :	2,97	2,91

*tempo para vesícula percorrer 60 μm ao aplicar +60 V

**tempo para vesícula percorrer 60 μm ao aplicar -60 V

***ME - unidades em (10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)

A Tabela 3.9 apresenta um exemplo de cálculo de Mobilidade Eletroforética (ME). Na primeira etapa, foram medidos os tempos de cada partícula para percorrer a distância de 60 μm ao aplicar o potencial de ±60 V. Quando a polaridade das cargas dos eletrodos era trocada, a direção de movimento das partículas mudava conforme a localização do eletrodo negativo, isto é, as partículas estavam carregadas positivamente e se movimentavam para o sentido do eletrodo carregado negativamente.

Na segunda etapa, foram obtidas as velocidades, ou seja, o inverso dos tempos. Em seguida, foram calculadas as médias das velocidades. Cada valor de velocidade foi aplicado na equação 3.2.10.1 para obtenção dos valores de ME. E finalmente, a ME para cada partícula foi a resultante da média destes dois valores de ME.

3.2.11 - Determinação da mobilidade eletroforética das partículas em misturas de DNA e DODAB (SUV)

Vesículas de DODAB SUV são muito pequenas para serem visualizadas através do microscópio de campo escuro do aparelho para microeletroforese de partículas. Assim, as partículas que são visualizadas para as misturas DODAB/DNA são aquelas originadas da transição bobina-glóbulo de DNA (Minagawa, K. et al., 1994) induzida por DODAB. Misturas DNA/DODAB contendo uma concentração final de DNA fixa [0,0003-0,002 mM (em nucleotídeos)] e quantidades de DODAB SUV crescentes (0 a 0,016 mM) foram incubadas a 37 °C por 30 min. Mobilidades eletroforéticas foram determinadas e em função da concentração de DODAB em duas a três diferentes concentrações de DNA.

Foram feitas misturas de vesículas pequenas de DODAB (SUV) com 2 diferentes tipos de DNA: DNA do fago T4 e DNA do fago λ. Estas misturas foram transferidas para aparelho de Rank Brothers Mark II Microelectrophoresis para medição da mobilidade eletroforética à temperatura de 25 ± 1 °C em função da concentração de DODAB com as concentrações de DNA fixas.

No caso de DNA do fago T4, foram fixadas 3 concentrações finais de DNA na mistura : 0,456 , 0,912 e 1,824 μM (em nucleotídeos). A cada uma dessas soluções foram adicionadas dispersões de DODAB (concentração final: 0 a 15 μM). Vide Tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Preparação das misturas DODAB/DNA T4

Mistura 1		Mistura 2		Mistura 3	
Dispersão de DODAB 100 μM (μL)	Concentração final de DODAB (μM)	Dispersão de DODAB 100 μM (μL)	Concentração final de DODAB (μM)	Dispersão de DODAB 100 μM (μL)	Concentração final de DODAB (μM)
0	0	0	0	0	0
10	0,10	20	0,20	40	0,40
30	0,30	60	0,60	80	0,80
50	0,50	100	1,00	120	1,20
100	1,00	200	2,00	200	2,00
150	1,50	300	3,00	300	3,00
200	2,00	400	4,00	400	4,00
250	2,50	500	5,00	600	6,00
300	3,00	600	6,00	800	8,00
400	4,00	800	8,00	1200	12,00
				1500	15,00

Mistura 1 - Adição de 10 μL de solução de DNA do fago T4 (0,456 mM em nucleotídeo) para obter concentração final de DNA de 0,456 μM (em nucleotídeo).*

Mistura 2 - Adição de 20 μL de solução de DNA do fago T4 (0,912 mM em nucleotídeo) para obter concentração final de DNA de 0,912 μM (em nucleotídeo) .*

Mistura 3 - Adição de 10 μL de solução de DNA do fago T4 (1,824 mM em nucleotídeo) para obter concentração final de DNA de 1,824 μM (em nucleotídeo).*

*após adição de DODAB conforme tabela e o volume ser completado até 10 mL com água.

No caso de DNA do fago λ, o liofilizado do frasco foi solubilizado em 1 mL de água e seguido o esquema do DNA do fago T4. Foram fixadas as concentrações finais de 0,308 e 0,616 μM e a concentração de DODAB também foi variada de 0 a 15 μM na solução final, conforme Tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Preparação das misturas DODAB/DNA λ

Mistura 1		Mistura 2	
Dispersão de DODAB 200 μM (μL)	Concentração final de DODAB (μM)	Dispersão de DODAB 200 μM (μL)	Concentração final de DODAB (μM)
0	0	0	0
10	0,20	20	0,40
20	0,40	40	0,80
30	0,60	60	1,20
50	1,00	100	2,00
70	1,40	140	2,80
100	2,00	200	4,00
150	3,00	300	6,00
200	4,00	400	8,00
300	6,00	600	12,00
400	8,00	800	16,00

Mistura 1 - Adição de 20 μL de solução de DNA do fago λ (1,59 x 10^{-9} M em DNA ou 0,154 mM em nucleotídeo) para obter concentração final de DNA de 3,18 x 10^{-12} M (em DNA) ou 0,308 μM em nucleotídeo.*

Mistura 2 - Adição de 40 μL solução de DNA do fago λ (1,59 x 10^{-9} M em DNA ou 0,154 mM em nucleotídeo) para obter concentração final de DNA de 6,36 x 10^{-12} M (em DNA) ou 0,616 μM em nucleotídeo.*

*após adição de DODAB conforme tabela e o volume ser completado até 10 mL com água.

A mobilidade eletroforética foi obtida conforme apresentado no item 3.2.10 e cada ponto da curva de ME é resultado da média das medições de velocidade para, pelo menos, 10 partículas.

3.2.12 - Determinação da eficiência de incorporação de [^{14}C]sacarose em função da concentração de DODAB

A eficiência de incorporação dos lipossomos de DODAB foi obtida pela diálise e marcação radioativa do compartimento aquoso intralipossomal (Tsuruta, L.R. et al., 1997). Iguais volumes de lipossomos preparados em água (DODAB 1 mM) contendo [^{14}C]sacarose (LS) e um controle de diálise de água contendo [^{14}C]sacarose (S) foram dialisados

separadamente em dois saquinhos de celulose e em cerca de 2 L de água em cada uma das 5 trocas de água e agitados vigorosamente. Antes da diálise, alíquotas de LS e S foram reservadas para determinação de eficiência de incorporação de [^{14}C]sacarose nos lipossomos (ENT). Após diálise, a radioatividade, em contagens por minuto (cpm), foi determinada para os dialisados e para as alíquotas reservadas. A incorporação pode ser obtida como (Tsuruta, L.R. et al., 1997, Augusto, O. & Carmona-Ribeiro, A.M, 1989):

$$ENT=(1/C)(cpm_2/cpm_1 - cpm_{2c}/cpm_{1c})$$ **(equação 3.2.12.1)**

onde 1 e 2 referem-se a contagens de LS antes e após a diálise, respectivamente; 1c e 2c são contagens de S antes e após diálise, respectivamente; C é a concentração molar de DODAB. Então, ENT é expressa em litros por mole (Tsuruta, L.R. et al., 1997).

3.2.12.1 – Preparação de vesículas de DODAB com conteúdo radioativo

Uma solução de [^{14}C]sacarose foi preparada pela diluição de 10 μL de [^{14}C]sacarose concentrada (1,0 mCi/10 mL) em 10 mL de água e vesículas de DODAB (obtidas por aquecimento ou por vaporização clorofórmica) foram preparadas nesta nova solução de [^{14}C]sacarose nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL (ou 3,2 , 6,4 , 9,6 , 12,8 e 16,0 mM). Estas preparações de DODAB foram submetidas às microtitulações com nitrato de mercúrio para precisar as concentrações e ainda foram reservados 50 μL de cada dispersão para determinação do nível de radioatividade.

Membranas de celulose para diálise foram preparadas com pré-ativação por aquecimento com solução de EDTA 0,1 mM por 30 minutos, seguida de lavagens sucessivas com água para eliminação do EDTA.

3.2.12.2 – Diálise das amostras

Alíquotas das dispersões de DODAB foram transferidas para saquinhos de celulose para diálise e submetidas à diálise em água, conforme esquema a seguir:

- 2 lavagens sucessivas em 1,0 L de água com agitação por 30 minutos cada
- 2 lavagens sucessivas em 1,5 L de água com agitação por 1 hora
- 1 lavagem em 1,5 L de água com agitação por 30 minutos

Obs.: Foi feita diálise com um branco que consistiu em solução de sacarose radioativa utilizada para preparar vesículas de DODAB.

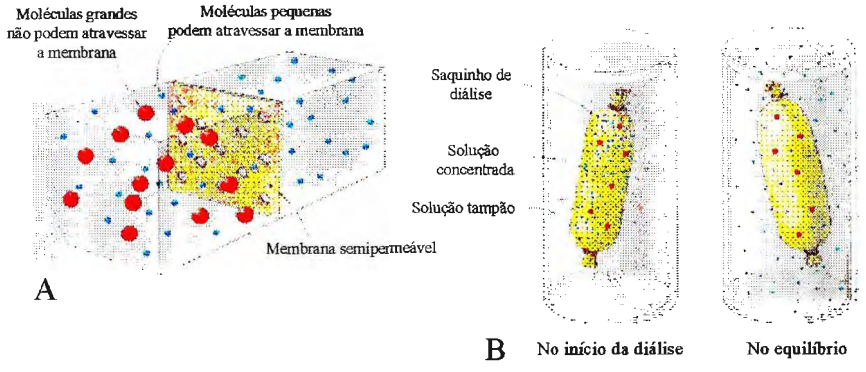


Figura 3.4 - Esquema de diálise por "saquinho" de membrana de celulose (Adaptado de Stryer, S., 1995)

3.2.12.3 – Preparação do líquido de cintilação

1 g de PPO foi dissolvido em 250 mL de tolueno e em seguida, foram adicionados 25 g de POPOP a esta solução. Após dissolução, foram adicionados ainda 125 mL de Triton X-100 e a mistura, homogeneizada.

3.2.12.4 - Leituras de radioatividade

Foram realizadas pré-leituras dos frascos contendo 5 mL do líquido de cintilação. Depois, foram transferidos 50 μL de misturas não dialisadas para 5 mL do líquido de cintilação, adicionados 200 μL de água e homogeneizados. Em outros frascos, foram transferidos 250 μL das misturas dialisadas para os 5 mL do líquido de cintilação e homogeneizados. Todos os frascos foram submetidos a novas leituras de radiação num detector de cintilação (Tri-CARB 1600 TR - Liquid Scintillation Analyzer).

3.2.12.5 – Cálculo de eficiência de incorporação de [^{14}C]sacarose radioativa em vesículas de DODAB

O cálculo de eficiência de incorporação de sacarose radioativa foi realizada segundo a equação 3.2.12.1 e foi construída uma curva de eficiência de incorporação de sacarose radioativa em função da concentração de DODAB.

3.2.13 - Determinação da ruptura vesicular (%R) pela interação DODAB/DMP

A ruptura vesicular induzida por DMP foi avaliada por 2 diferentes ensaios: diálise convencional e diálise de equilíbrio. As concentrações finais de DODAB e DMP nas misturas submetidas à diálise convencional ou diálise de equilíbrio foram 0,5 e 1,0 mM, respectivamente.

3.2.13.1 – Diálise convencional em saquinhos de celulose

Foi preparada por aquecimento uma dispersão de DODAB 1 mM em solução de sacarose radioativa e microtitulada com solução de nitrato de mercúrio para determinar sua concentração. Foi preparada também solução aquosa de DMP 2 mM. Em seguida, foi feita a mistura da dispersão de DODAB e solução de DMP na proporção de 1:1 (v/v) e levadas à incubação a 37 °C por 30 minutos. Depois, as misturas foram transferidas para os saquinhos de diálise e dialisados em água (3 trocas sucessivas com 2 L de água cada).

Observar que foi preparado um branco com dispersão de DODAB e água (1:1 v/v) e também, um controle de diálise com solução de sacarose radioativa.

As radioatividades foram medidas antes (cpm_1) e após a diálise (cpm_2).

- Cálculo da porcentagem de ruptura (% R_d):

$$\% \text{ Ruptura} = [(cpm_1 - cpm_2)/cpm_1] \times 100 \qquad \textbf{(equação 3.2.13.1)}$$

onde:

cpm_1 – cintilações por minuto antes da diálise

cpm_2 – cintilações por minuto depois da diálise

3.2.13.2 – Diálise de equilíbrio

DODAB, DMP e membrana de celulose foram preparados como no item 3.2.13.1 até a fase das incubações a 37 °C por 30 minutos. Depois, 0,9 mL de cada mistura incubada foi colocada no lado **A** de uma hemicâmara de diálise de equilíbrio e no lado **B**, foi colocada 0,9 mL de água. Isto é, o dialisado LS (lipossomo com sacarose[^{14}C] radioativa) contendo uma radioatividade total igual a $\mathbf{cpm_{total}}$ (ou cpm_{1A}) foi previamente adicionado à solução DMP e a mistura foi incubada (30 minutos a 37 °C) e colocada na hemicâmara *a* de uma câmara de diálise de equilíbrio, sendo que o extravazamento foi inferido da radioatividade total em hemicâmara *b* (cpm_b ou cpm_{2A}) até o equilíbrio ser atingido entre os compartimentos *a* e *b*, que foram separados por uma membrana de diálise de celulose, conforme Figura 3.5.

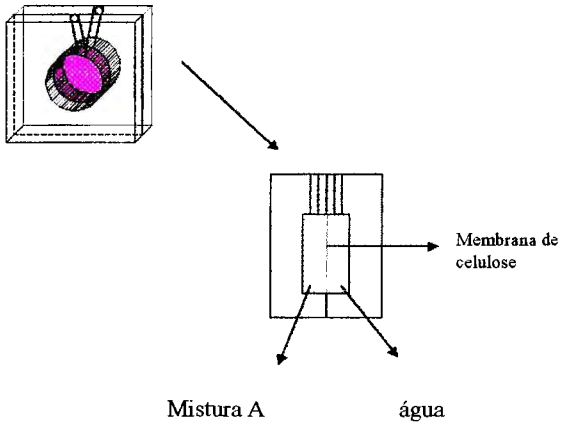


Figura 3.5 - Esquema de hemicâmara para diálise de equilíbrio

De ambos os lados (**A** e **B**), foram retiradas alíquotas de 50 μL nos tempos:
0 – 30 min – 1,5 h – 2,5 h – 3,5 h – 4,5 h – 5,5 h – 6,5 h

Cada uma dessas alíquotas de 50 μL foram transferidas para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação (e que tiveram determinados previamente os seus valores de contagem de fundo). Foram adicionados 200 μL de água a cada uma das misturas anteriores, homogeneizados e realizadas leituras de radioatividade no cintilador da Packard, o Tri-CARB 1600 TR-Liquid Scintillation Analyzer.

Para o cálculo da % de ruptura vesicular no equilíbrio (% R_e), foram considerados os valores médios dos resultados dos lados A e B.

Lado A :

$\% \text{ Ruptura}_A = [(cpm_{2A}/(cpm_{1A}/2)] \times 100$ **(equação 3.2.13.2)**

Lado B :

$\% \text{ Ruptura}_B = [(cpm_{2B} - cpm_{1B})/(cpm_{1A}/2)] \times 100$ **(equação 3.2.13.3)**

onde:

cpm - cintilações por minuto

1,2 - início e fim da diálise

A, B - compartimentos A e B da hemicâmara de diálise

cpm_{2A}, cpm_{2B} – cintilações por minuto no tempo final da diálise

cpm_{1A}, cpm_{1B} – cintilações por minuto no tempo inicial da diálise

3.2.14 - Determinação da ruptura vesicular pela interação DODAB/DNA

A ruptura de vesícula induzida por DNA foi avaliada para DNAs λ e T4 por ensaios de diálise de equilíbrio. Vesículas de DODAB foram preparadas por aquecimento a 56 °C por 30 minutos em solução de sacarose radioativa. Parte desta solução foi dialisada exaustivamente (5 x 1,5 L de água, período total de 24 horas) e microtitulada com nitrato de mercúrio para determinação da concentração de DODAB.

As vesículas de DODAB dialisadas foram submetidas à interação com DNA nas proporções da condição de mobilidade eletroforética máxima para cada DNA (T4 e λ), isto é:

DNA T4 concentração final na mistura: 91,2 μM (em nucleotídeo)
Concentração final de DODAB aquecida na mistura: 1 mM
Mistura: 200 μL DNA T4 0,456 mM (em nucleotídeo) +
800 μL DODAB 1,25 mM

DNA λ concentração final na mistura: 30,8 μM (em nucleotídeo)
Concentração final de DODAB aquecida na mistura: 1 mM
Mistura: 200 μL de fago λ 0,154 mM (em nucleotídeo) +
800 μL DODAB 1,25 mM

Cada mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C e um volume de 0,9 mL transferido para o lado A de uma hemicâmara de diálise de equilíbrio. No lado B, foi colocado 0,9 mL de água.

Além das amostras com misturas de DODAB/DNA, também foram submetidos à diálise em hemicâmara os seguintes controles:

a) solução de sacarose radioativa
b) mistura constituída por 0,8 mL de dialisado de vesícula de DODAB 1,25 mM contendo sacarose radioativa + 0,2 mL de água

As diálises foram realizadas em duplicata e de ambos os lados da hemicâmara (A e B) foram retiradas alíquotas de 50 μL nos seguintes tempos:

0 – 30 min – 1,5 h – 2,5 h – 3,5 h – 4,5 h – 5,5 h – 6,5 h

Essas alíquotas foram transferidas para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação cujas contagens de fundo foram previamente determinadas. Foram adicionados ainda 200 μL de água, homogeneizados e submetidos às leituras no cintilador.

As porcentagens de ruptura foram obtidas analogamente ao descrito no item 3.2.13 para ruptura vesicular induzida por DMP e conforme equação 3.2.13.3.

3.2.15 - Otimização da geometria de inserção do nucleotídeo na bicamada

Foram realizadas minimizações de energia, utilizando o módulo DISCOVER do pacote INSIGHT II (Molecular Simulations Inc., San Diego) numa *workstation* IBM RS 6000-3AT. Foi utilizada uma constante dielétrica $\varepsilon = 3$ para mimetizar o ambiente de uma bicamada lipídica e uma convergência de minimização sendo obtidas por derivação de energia menores que 0,05 kcal/(mol*A).

3.2.16 - Determinação das concentrações de DNAs do mercado através de determinação de fosfato (Rouser, G. et al., 1970)

O método consistiu na determinação do fosfato após digestão dos DNAs com ácido perclórico a 180 °C. O fosfato resultante reagiu com molibdato de amônio em presença de ácido ascórbico, formando um complexo azulado, permitindo medidas de Absorbância na região do visível e determinação de sua concentração na solução, mediante comparação com curva padrão de fosfato de sódio.

Foram transferidos 100 μL de cada amostra de DNA para cada um dos tubos de vidro (foram feitas em triplicata, quando possível) e evaporada a água em estufa a 80-100 °C. Foram adicionados 300 μL de ácido perclórico concentrado e os tubos cobertos com bolas de vidro para evitar evaporação e deixados em digestor a 180 °C por 3 horas. Foram submetidos ao mesmo tempo, padrões de fosfato de sódio e o controle, conforme item 3.2.3. Todos os tubos (amostras de DNA e padrões) foram resfriados até temperatura ambiente e adicionados em cada um, 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25%, agitando-se em seguida. Foram adicionados 0,4 mL de ácido ascórbico 5% e novamente agitados. Em seguida, foram colocados em banho fervente por 5 minutos, com os tubos fechados com bolas de vidro. Finalmente, leituras de absorbância foram realizadas a 795-797 nm contra ponto zero da curva padrão construída conforme descrito no item 3.2.3.

As concentrações de DNA (em nucleotídeos) foram obtidas por interpolação na curva padrão de fosfato, similarmente ao descrito para determinação de nucleotídeo DMP no item 3.2.3.

Na Tabela 3.12, apresentamos os resultados da análise de DNAs, adquiridos da Sigma, através de dosagem de fosfato, e confirmamos os valores rotulados com algumas variações. E complementando, apresentamos na Tabela 3.13 as propriedades destes DNAs,

isto é, os seus pesos moleculares, pares de bases e as concentrações rotuladas (em nucleotídeos) e as concentrações obtidas através de dosagem de fosfato.

Tabela 3.12 – Resultados da determinação de fosfato nas amostras de DNA

Tipos de DNAs	Concentração teórica (mM, em nucleotídeos)	Absorbância (795 nm)	Teor de Fosfato em 100 μL de solução (nmol)	Teor de Fosfato (mM)
Lambda	0,154	0,217	19,53	0,20
		0,199	17,78	0,18
			Média:	0,19
T2	0,149	0,2	17,88	0,18
		0,215	19,34	0,19
		0,206	18,46	0,185
			Média:	0,18
T5	0,15	0,152	13,21	0,13
		0,159	13,89	0,14
		0,169	14,86	0,15
			Média:	0,14
T7	0,15	0,188	16,71	0,17
		0,187	16,61	0,17
		0,187	16,61	0,17
			Média:	0,17
T4	0,455	*	13,22 nmol em 25 μL	0,52

*dosagem de fosfato utilizando outra curva padrão de fosfato e quantidade de amostra mais restrita (25 μL), porém, utilizando a mesma técnica de dosagem.

Tabela 3.13 - Propriedades dos DNAs e concentrações analíticas de DNAs obtidas pelo método de determinação do fosfato

Tipo de DNA	Peso Molecular (Da)	Número de pares de bases	Concentração de DNA (mM de nucleotídeos) rotulada	Concentração de DNA (mM de nucleotídeos) obtida analiticamente
λ	$31,5 \times 10^6$	48.502	0,15	0,19
T4	110×10^6	~167.000	0,46	0,52
T2	110×10^6	~ 164.000	0,15*	0,18
T5	68×10^6	~103.000	0,15*	0,14
T7	25×10^6	~37.900	0,15*	0,17

*concentração na solução 1 U/mL

3.2.17 - Determinação da adsorção de vesículas de DODAB (SUV) aos DNAs de bacteriófagos

A interação DNA/vesículas pequenas de DODAB sob condições de excesso de DODAB foi estudada através da mistura de 0,5 mL de uma dispersão de DODAB (cerca de 1,1 mM) com 0,05 mL de uma solução de DNA (0,050-0,150 mM em concentração de nucleotídeo) para dar concentrações finais de cerca de 1,0 mM de DODAB e 0,005-0,015 mM de DNA em nucleotídeos. Então, a mistura foi incubada (30 minutos/37 °C), centrifugada (15.000 g/1 h/15 °C), e o sobrenadante foi filtrado através de membranas de policarbonato (porosidade 0,2 μm) para separar DODAB adsorvido ao DNA de DODAB livre. A concentração de DODAB não adsorvido (ou livre) na mistura foi determinada na solução filtrada por solubilização do complexo de DODAB/orange G em micelas não iônicas de Brij (Stelmo, M. et al., 1987).

O observado foi que a macromolécula de DNA com DODAB nela adsorvido ficou retida enquanto DODAB SUV livre passou através do filtro. A concentração de DODAB adsorvida foi medida indiretamente e pelo menos em quadruplicata para cada mistura e expressa como concentração de DODAB adsorvida ± desvio padrão médio.

3.2.17.1 – Adsorção de vesículas de DODAB SUV ao DNA de bacteriófagos T4 e λ

0,5 mL de uma dispersão a 1,0 mM de vesículas de DODAB obtidas por sonicação foi misturada com 50 μL de DNA de fago T4 (de concentração de 0,456 mM em nucleotídeo) ou de fago λ (0,154 mM em nucleotídeo), incubadas a 37 °C por 30 minutos, centrifugadas a 15.000 g por 1 hora e depois, filtradas através de membrana de policarbonato com porosidade de 0,2 μm. O filtrado foi utilizado para determinar DODAB pelo método do Brij.

A partir da curva de mobilidade eletroforética em função da concentração de DODAB, determinou-se a proporção necessária entre DNA e DODAB para obtenção de mobilidade eletroforética máxima (e positiva). Garantida esta condição, foram realizadas pelo menos em octuplicata, dosagens para cada mistura.

Tabela 3.14 - Proporções molares de DODAB : DNA (em nucleotídeos) nas misturas

situação	DODAB: T4 DNA	DODAB : λ DNA
a	22 : 1	65 : 1
b	44 : 1	130 : 1

3.2.17.2 - Adsorção de vesículas de DODAB ao DNA de bacteriófagos T2, T5 e T7

Para estimar a adsorção de DODAB SUV ao DNA foi seguida a proporção entre DNA e DODAB na situação de mobilidade eletroforética máxima como no item 3.2.17.1 e apresentada na Tabela 3.15.

Tabela 3.15 - Esquema de preparação das misturas DODAB-DNA para determinação da adsorção de vesículas de DODAB às moléculas de DNA

DNA	Volume de DNA	Volume de DODAB 1,10 mM (μL)	Concentração final de DNA na mistura (μM)	Concentração final de DODAB na mistura (mM)
T2	50 μL de solução a 1,49 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	14	1
T2	50 μL de solução a 0,75 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	7	1
T5	50 μL de solução a 1,50 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	14	1
T5	50 μL de solução a 0,75 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	7	1
T7	50 μL de solução a 1,50 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	14	1
T7	50 μL de solução a 0,75 x 10^{-4} M (em nucleotídeo)	500	7	1

Feitas as misturas, estas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, centrifugadas a 15.000 g por 1 hora e depois, filtradas através de membrana de policarbonato com porosidade de 0,2 μm. O filtrado foi utilizado para determinar DODAB analiticamente pelo método do Brij e as dosagens realizadas foram pelo menos em octuplicata para cada mistura.

3.2.18 - Determinação do deslocamento de cromóforos ou marcadores fluorescentes pela interação DNA/membrana catiônica

Dois marcadores (Vide Figura 3.6) foram utilizados separadamente para monitorar a ocorrência do deslocamento destes devido à interação DODAB/DNA: merocianina 540 (MC) (Lelkes, P.I. & Miller, I.R., 1980), um marcador fluorescente para marcar sítios hidrofóbicos da bicamada de DODAB (Carmona-Ribeiro, AM., 1993), e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um marcador fluorescente hidrossolúvel com afinidade pelo sulco menor de DNA, para observar a transição de fita estendida para glóbulo em moléculas de DNA por microscopia de fluorescência (Minagawa, K. et al., 1994).

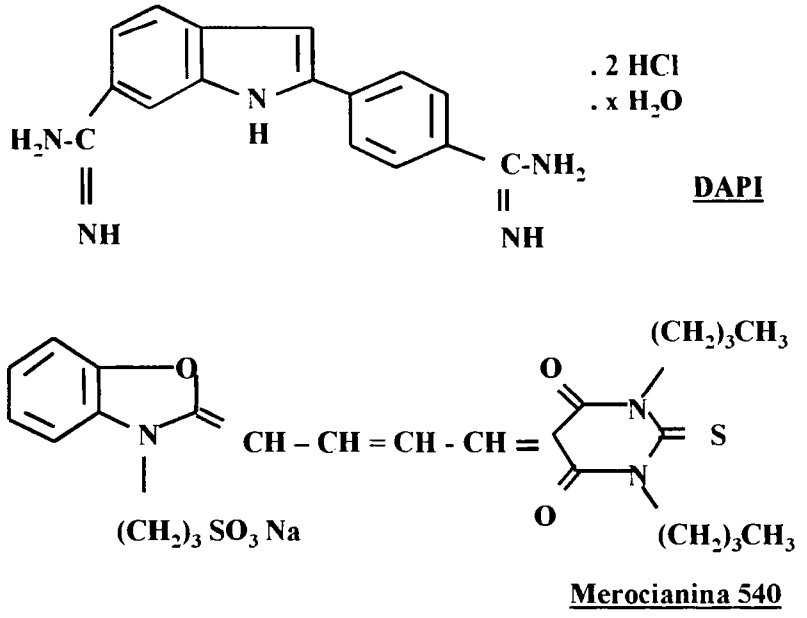


Figura 3.6 - Estruturas químicas de DAPI e Merocianina 540

Soluções-estoque de DAPI e MC foram preparadas em água nas concentrações de 0,012 e 1,0 mM, respectivamente e as concentrações finais de DAPI e MC nas misturas DODAB/DNA ou em DODAB/nucleotídeo (com 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato, DMP, como o nucleotídeo testado) foram 0,0006 e 0,010 mM, respectivamente. Os espectros óptico (para MC) ou de fluorescência (para DAPI) foram registrados em 3 diferentes condições experimentais: (1) o marcador sozinho em água, (2) o marcador em DNA ou em DODAB, (3) o marcador nas misturas de DNA/DODAB ou de DMP/DODAB. Controles

brancos adequados foram preparados para medidas de turbidez de vesículas e/ou DNA com os mesmos componentes, porém, sem marcador.

3.2.18.1 – Deslocamento de Merocianina a partir da bicamada

Foram preparadas misturas de DODAB e solução de DMP nas condições da Tabela 3.16 para observar o efeito do nucleotídeo sobre espectro de absorção de luz da merocianina 540 incorporada em lipossomos grandes de DODAB.

Tabela 3.16 – Preparação de misturas DODAB/DMP. Misturas de volumes de 0,4 mL de dispersão de DODAB 0,5 mM e 2,0 mL de solução de DMP para uma concentração final de DODAB na mistura de 0,08 mM e de DMP mostrado nesta Tabela.

Concentração da solução de DMP adicionada (mM)	Concentração final de DMP na mistura (mM)
0,50	0,42
1,50	1,25
1,80	1,50

De cada mistura, foram transferidos 1,0 mL para cubeta de referência e outro mL, após adicionado de 4 μL de solução de merocianina 2,5 mM (concentração final de merocianina na mistura = 10^{-5} M, conforme Arroyo, J. et al., 1998), para a cubeta de amostra e realizada varredura entre 460 e 600 nm no espectrofotômetro Hitachi.

Para verificar o efeito do DNA de fago λ ou fago T4 sobre os espectros de merocianina (MC) incorporada em lipossomos de DODAB obtidos por aquecimento ou por vaporização clorofórmica foram preparadas as misturas, conforme Tabela 3.17:

Tabela 3.17 – Preparação de misturas DODAB/DNA (proporção molar 1:2) para espectrometria de merocianina

Volume de água (mL)	Volume de DNA do fago λ 0,15 mM (em nucleotídeo) (mL)	Volume de DNA do fago T4 0,46 mM (em nucleotídeo) (mL)	Volume de dispersão de DODAB 0,08 mM (mL)	Volume de dispersão de DODAB 0,23 mM (mL)
0,5	-	-	0,5	-
-	0,5	-	0,5	-
0,5	-	-	-	0,5
-	-	0,5	-	0,5

Cada mistura foi submetida à incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e foram separados 0,5 mL para referência e 0,5 mL para adição de 2 μL de merocianina 2,5 mM e feita varredura entre 460 e 600 nm no espectrofotômetro Hitachi.

3.2.18.2 – Deslocamento de marcador fluorescente (DAPI) a partir dos sulcos menores de DNA

Foi preparada uma solução de DAPI 0,012 mM, pesando 2 mg para 1,0 mL de água (solução-mãe 5,7 x 10^{-3} M) e diluindo 2,1 μL desta solução para 1,0 mL com água. Foi tomado cuidado no manuseio do DAPI para evitar incidência de luz e sua degradação.

A partir da solução de DAPI 0,012 mM, foram preparadas novas soluções do marcador com concentrações crescentes, conforme Tabela 3.18 para observar o efeito da concentração de DAPI sobre seus espectros de fluorescência.

Tabela 3.18 – Preparação de soluções de DAPI

Volume da solução de DAPI 0,012 mM (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final de DAPI (μM)
0,2	9,8	0,2
0,5	9,5	0,6
0,8	9,2	1,0

Cada solução foi submetida à excitação em 365 nm e obtidos os espectros de emissão de fluorescência em espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500. Espectros de excitação também foram obtidos na faixa de 260 a 400 nm.

Cada mistura preparada conforme Tabela 3.19 também foi submetida à excitação e emissão de fluorescência no espectrofotômetro de fluorescência Hitachi para observar o efeito da concentração do DNA do fago T4 ou fago λ sobre os espectros de fluorescência do DAPI (0,6 μM DAPI).

Tabela 3.19 – Preparação de soluções de DAPI-DNA

Volume da solução de DAPI 12 μM (mL)	Volume de DNA 12 μM (em nucleotídeo) (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final de DNA (em nucleotídeo) (μM)
0,5	0,2	9,3	0,2
0,5	0,5	9,0	0,6
0,5	0,8	8,7	1,0

Foram preparadas as soluções da Tabela 3.20, procedendo-se à obtenção dos espectros de fluorescência para observar o efeito da concentração de DODAB sobre espectros de fluorescência de DAPI a 0,6 μM em DNA do fago T4 ou fago λ (0,6 μM DAPI).

Tabela 3.20 – Preparação de soluções DAPI-DODAB, com volumes fixos de 0,5 mL para soluções de DAPI 12 μM e de DNA 12 μM (em nucleotídeos)

Volume de dispersão de DODAB 0,1 mM (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final de DODAB (μM) na mistura após diluições
0,2	8,8	2
0,6	8,4	6
1,0	8,0	10

3.2.19 - Determinação do efeito do DODAB sobre hipocromismo do DNA dupla fita

A temperatura afeta a molécula de DNA, causando separação das fitas complementares da dupla hélice e causando hipercromismo em 260 nm. Para determinar algum efeito de DODAB SUV sobre a dupla hélice de DNA, curvas de fusão para vários tipos de DNAs de bacteriófagos (λ, T2, T5 e T7) foram obtidas na presença ou ausência de lipossomos de DODAB SUV.

Dentro de uma cubeta de quartzo contendo misturas DODAB SUV/DNA em concentrações finais de 1,0 e 0,014 mM, respectivamente, absorbâncias em 260 nm foram registradas como uma função da temperatura. A temperatura foi variada usando um banho com circulação externa conectada ao suporte da cubeta. O controle da temperatura foi feito através de um termômetro digital Jencons, modelo 2003, acoplado a um termopar inserido diretamente na amostra. A velocidade de variação de temperatura foi constante e igual a cerca de 1,0 °C/min.

Em um segundo grupo de experimentos usando condições similares, a Absorbância em 260 nm foi medida para cada mistura em 35 ou 85 °C e comparada com Absorbância para DNA sozinho. O hipercromismo foi considerado como a diferença entre as absorbâncias a 85 e 35 °C (ΔA).

Como branco para misturas DODAB/DNA foi usada uma dispersão de DODAB com a mesma concentração final de DODAB da mistura DODAB/DNA. Para amostras de DNA, o branco foi a mesma solução em que DNA estava, isto é, água pura.

As misturas DNA-DODAB foram as seguintes, observando-se condição de excesso de DODAB em relação ao DNA: 50 μL de solução de DNA a 0,154 mM (em nucleotídeos) e

500 μL de dispersão de DODAB SUV a 1,10 mM (obtendo na mistura final, as concentrações de 14 μM e 1,0 μM, respectivamente para DNA e DODAB).

Para melhores detecção e visualização da diferença entre as absorbâncias a 85 e 35 °C, as concentrações das dispersões de DODAB e das soluções de DNA foram dobradas e neste caso foram: 100 μL de solução de DNA a 0,154 mM + 450 μL de dispersão de DODAB SUV a 2,44 mM (obtendo na mistura final, as concentrações de 28,8 μM e 2,0 mM, respectivamente para DNA e DODAB).

Para as soluções de referência foram utilizadas misturas de DODAB com água no lugar de DNA e as leituras de absorbância foram realizadas de 35 a 85 °C a 260 nm no espectrofotômetro Ciba-Corning, com controle de temperatura.

3.2.20 - Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH 5α

Foram feitas tentativas de transformar a bactéria *E. coli* DH 5α, seguindo os protocolos clássicos (Sambrook, J. et A., 1989, Perbal, B.V., 1988), obtendo células competentes que foram transformadas pelo método do cloreto de cálcio ou utilizando o complexo plasmidial obtido por interação com DODAB. Na primeira série de experimentos, foram utilizadas vesículas pequenas de DODAB (obtidas por sonicação) e na segunda série, vesículas gandes (obtidas por aquecimento).

As transformações foram detectadas através de plaqueamento das misturas contendo bactérias sobre meio sólido de Mueller Hinton com ampicilina, pois, como o plasmídeo pSV-β-galactosidase apresenta gene que confere resistência à ampicilina, as bactérias transformadas deveriam crescer na presença deste antibiótico.

3.2.20.1 - Obtenção de bactérias competentes:

Foi feito repique do microrganismo no dia anterior ao experimento, transferindo uma alçada da cultura de bactérias para meio sólido de Mueller-Hinton ágar inclinado.

No dia do experimento, foram transferidos 5 mL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) para o ágar inclinado, raspados os microrganismos da superfície do meio e tranferido 0,5 mL da suspensão assim obtida para 25 mL de meio TSB em balão de fundo chato. Este foi colocado em *shaker* a 80-100 rpm a 35 °C por 2 horas e depois, 1 mL da suspensão foi transferido para cada um dos 2 tubos Eppendorf.

Os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm (1.300 g) por 5 minutos a 20 °C e retirado o sobrenadante (meio TSB). Foram adicionados mais 1,5 mL da suspensão sobre os *pellets* e centrifugados novamente, desta vez a 5.000 rpm (2.000 g) por 4 minutos a 20 °C. O sobrenadante (meio TSB) foi retirado com pipeta Pasteur.

Foi transferido 1,0 mL de tampão acetato de sódio 20 mM pH 6,5 + $CaCl_2$ 0,1 M (frio) e deixado no gelo por 20 minutos. Depois, foi feita centrifugação a 5.000 rpm (2.000 g) por 4 minutos a 20 °C. O *pellet* foi ressuspendido em 1,0 mL do tampão acetato de sódio 20 mM pH 6,5 + $CaCl_2$ 0,1 M (frio) e deixado 50 minutos no gelo. Foi feita nova centrifugação e retirado o "excesso" de sobrenadante, até ficar com 0,1 mL de sobrenadante no Eppendorf.

As bactérias foram ressuspendidas no próprio Eppendorf com a mesma pipeta Pasteur, misturadas as suspensões dos 2 Eppendorfs, homogeneizados e 0,1 mL foi redistribuído para cada um dos Eppendorfs.

3.2.20.2 - Transformação das bactérias competentes usando DODAB

Foram feitos 2 tipos de preparações com bactérias competentes:

a) Tubo A1: (Método clássico - com Cloreto de cálcio)

Foi transferido 1 μL (correspondente a 100 ng) de plasmídeo pSV-β Galactosidase para 0,1 mL de suspensão de bactérias competentes e homogeneizado com a própria ponteira da pipeta.

b) Tubo A2: (Utilização de DODAB)

Dispersão de DODAB SUV 2,12 mM foi diluída em glicose 0,246 M na proporção de 1:10 , e esterilizada por filtração.

Foram transferidos 50 μL de DODAB 0,2 mM para 50 μL de água estéril e adicionado 1 μL (correspondente a 100 ng) de solução contendo plasmídeo. Interação foi feita por 15 minutos à temperatura ambiente e transferido o total de 100 μL para 0,1 mL de suspensão de *E. coli* .

c) Tubos A1 e A2:

Os tubos foram colocados em gelo e deixados por 20 minutos. Passado este período, os tubos foram submetidos ao choque térmico por 2 minutos exatos a 42 °C. Logo

em seguida, foi adicionado 1 mL de meio TSB em cada tubo e incubados a 35 °C em banho-maria por uma hora, sem agitação.

Foram feitas diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} em água estéril, e foram plaqueadas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} em meio sólido de Mueller-Hinton e meio sólido de Mueller-Hinton + Ampicilina 50 μg/mL.

As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 18-24 horas e feitas contagens das colônias formadas.

O próximo objetivo foi comparar eficácia de transformação das bactérias competentes através de complexos plasmidiais formados por vesículas de DODAB pequenas (obtidas por sonicação) ou vesículas grandes (obtidas por aquecimento), pois nas condições anteriores, pudemos obter bactérias transformadas, utlizando vesículas sonicadas na complexação com DNA plasmidial.

a) Tubo B1: (método clássico - com cloreto de cálcio)

Foi transferido 1 μL (corespondente a 100 ng) de plasmídeo pSV-β Galactosidase para 0,1 mL de suspensão de bactérias e homogeneizado com a própria ponteira da pipeta.

b) Tubo B2: (utilização de vesículas de DODAB obtidas por sonicação)

Previamente, foram preparados:

1) 1 μL do vetor plasmidial (correspondente a 100 ng de plasmídeo pSV-β Galactosidase) + 49 μL de água

2) preparação de DODAB sonicada 0,2 mM estéril

A mistura plasmidial foi preparada pela interação de 50 μL de 1) + 50 μL de 2) por 30 minutos à temperatura ambiente.

Foram transferidos 100 μL da mistura anterior para o Eppendorf com *pellet* de *E. coli*.

c) Tubo B3: (utilização de vesículas de DODAB obtidas por aquecimento)

Foi seguido o mesmo procedimento que para o Tubo B2, porém, trabalhando com vesículas de DODAB preparadas por aquecimento.

d) Tubos B1, B2 e B3:

Os 3 tubos foram colocados no gelo por 20 minutos e depois seguido o procedimento como para os tubos A1 e A2.

Nota da BCQ: No impresso, não consta a página 69

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Quantificação da adsorção de nucleotídeos ao DODAB

4.1.1 - Obtenção das isotermas de adsorção do nucleotídeo sobre vesículas de DODAB

A Figura 4.1A ilustra uma isoterma de adsorção de DMP em vesículas de DODAB em água obtidas por aquecimento em água pura e a Figura 4.1B ilustra uma isoterma de adsorção de DMP em vesículas de DODAB em água obtidas por vaporização clorofórmica. A partir do patamar destas isotermas, pôde-se calcular a relação molar DODAB/DMP nas condições de adsorção máxima (Tabela 4.1). Deve-se ressaltar que o DMP foi adicionado ao meio extravesicular.

Verificou-se que a relação molar DODAB:DMP é de aproximadamente 2:1 para preparações aquecidas em água. Uma molécula de DMP está ligada a duas moléculas de DODAB quando o nucleotídeo é adicionado por fora. Para DODAB obtida por vaporização clorofórmica, observou-se uma relação similar.

A Figura 4.1 mostra duas isotermas de adsorção de DMP sobre lipossomos grandes de DODAB em água. Ambos os métodos de preparação de vesículas unilamelares grandes de DODAB (aquecimento e vaporização clorofórmica) apresentaram perfis similares de adsorção de nucleotídeo sobre os lipossomos. A uma concentração fixa de DODAB (0,5 mM), houve um aumento langmuiriano na adsorção de DMP sobre as vesículas de DODAB em função da concentração final de nucleotídeo, sendo que a adsorção limite foi atingida em torno de 1,0 mM de DMP adicionada.

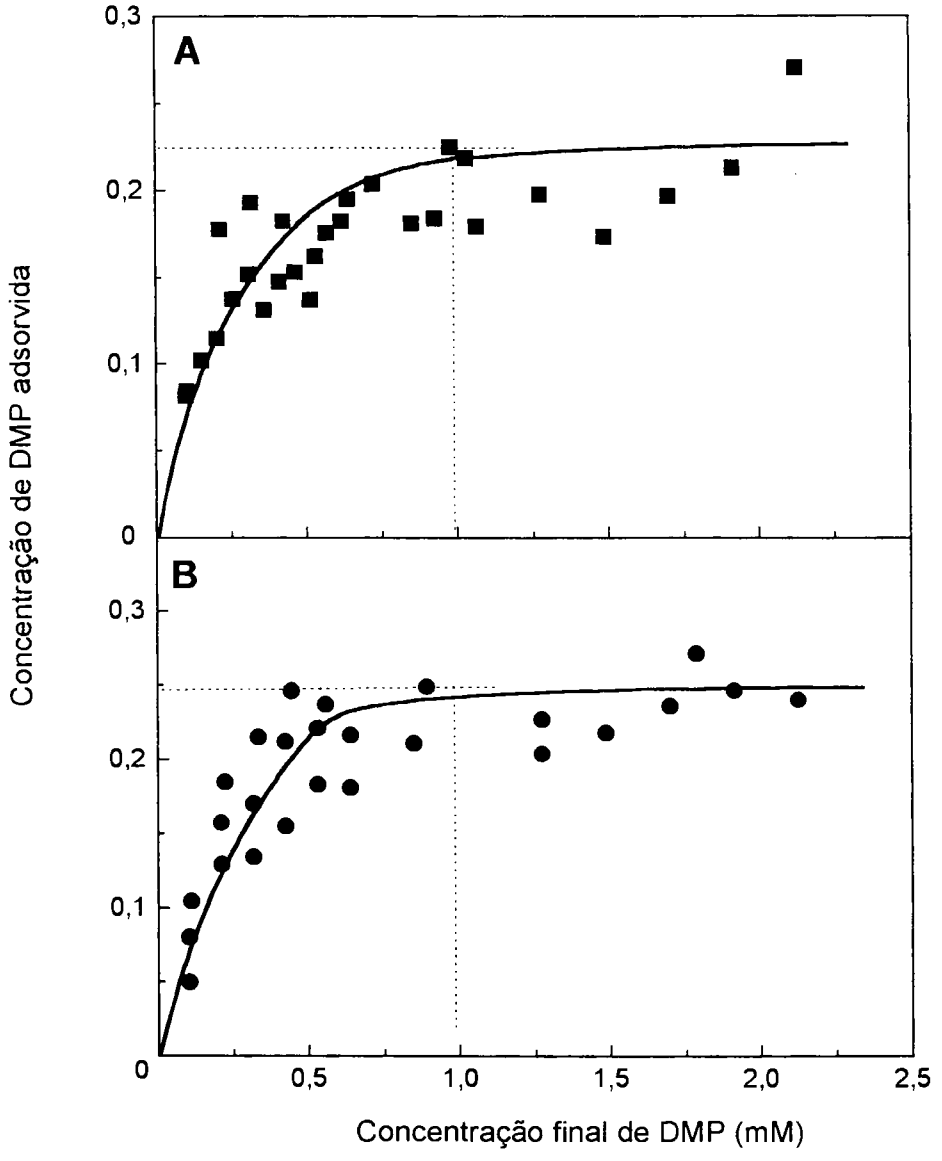


Figura 4.1 - Isotermas de adsorção de DMP sobre vesículas grandes de DODAB em água. As vesículas foram obtidas por aquecimento (■) ou vaporização clorofórmica (●). A proporção molar DODAB-DMP no ponto de adsorção máxima é ~2:1. Concentração final de DODAB = 0,5 mM (concentração total na mistura). *Concentração final de DMP é a concentração total de DMP na mistura.

Tabela 4.1 - Determinação da proporção molar DODAB/DMP obtida para adição de DMP ao meio extravesicular com interação à temperatura de 37 °C, com concentrações finais na mistura de DODAB de cerca de 0,50 mM e de nucleotídeo a 0,80 mM

Tipo de preparação das vesículas de DODAB	Conc.final de DODAB na solução (mM)	Conc. adsorvida de DMP (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecimento	0,51	0,21	2,4:1,0
	0,51	0,21	2,4:1,0
	0,56	0,23	2,4:1,0
	0,50	0,20	2,5:1,0
vaporização clorofórmica	0,38	0,16	2,4:1,0
	0.53	0,18	2,9:1,0

4.1.2 - Efeito da temperatura de interação DODAB/nucleotídeo na proporção molar DODAB:DMP

As relações molares DODAB:DMP na Tabela 4.2 não mostram diferenças significativas em função de temperatura de interação e, portanto, não dependem do estado físico da bicamada.

Tabela 4.2 - Efeito da temperatura de incubação do complexo e do tipo de vesícula de DODAB sobre a proporção molar DODAB/DMP na concentração final de DMP ($[DMP]_{mistura}$) fixada em 0,80 mM na mistura

T_{DODAB}	$t^o_{interação}$ (°C)	$[DODAB]_{mistura}$ (mM)	$[DMP]_{adsorvida}$ (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecida	30	0,50	0,18	2,8 : 1,0
		0,52	0,184 ± 0,010	2,8 : 1,0
		0,52	0,212 ± 0,010	2,5 : 1,0
	44	0,50	0,24	2,1 : 1,0
		0,52	0,213 ± 0,018	2,4 : 1,0
		0,52	0,262 ± 0,049	2,0 : 1,0
	56	0,50	0,21	2,4 : 1,0
injetada	30	0,52	0,23	2,3 : 1,0
		0,51	0,14 ± 0,015	3,6 : 1,0
		0,51	0,142 ± 0,013	3,6 : 1,0
	37	0,53	0,18	2,9 : 1,0
		0,52	0,15	3,5 : 1,0
	44	0,52	0,22	2,4 : 1,0
		0,51	0,163 ± 0,016	3,1 : 1,0
		0,51	0,163 ± 0,011	3,1 : 1,0
	56	0,51	0,246 ± 0,018	2,1 : 1,0
		0,51	0,209 ± 0,030	2,8 : 1,0

Obs.: T_{DODAB} - Tipo de preparação de vesículas de DODAB; $t^o_{interação}$ - Temperatura de interação DODAB-nucleotídeo; $[DODAB]_{mistura}$ - Concentração de DODAB na mistura; $[DMP]_{mistura}$ - Concentração de DMP na mistura; $[DMP]_{adsorvida}$ - Concentração adsorvida de DMP

*Desvio padrão obtido pela fórmula: $\delta=\{[\Sigma(x-m)^2]/n\}^{1/2}$, onde; x=concentrações na adsorção, m=média dos valores de x, n=8 (nº de dados).

4.1.3 - Efeito da preparação de vesículas de DODAB em solução de DMP

Nesta etapa, tentou-se colocar nucleotídeo no compartimento interno aquoso das vesículas, dispersando o DODAB diretamente na solução contendo nucleotídeo. Os resultados da Tabela 4.3 mostram que nessa situação, não houve diferenças significativas na relação molar DODAB/DMP com relação à situação de adição do DMP apenas por fora da vesícula, isto é, extravesicularmente (vide Tabela 4.2). Parece que o nucleotídeo interagiu por inserção na bicamada.

Tabela 4.3 - Determinação da proporção molar DODAB/DMP na preparação de vesículas de DODAB na solução contendo nucleotídeo

T_{DODAB}	$[DODAB]_{mistura}$ (mM)	$[DMP]_{mistura}$ (mM)	$[DMP]_{adsorvida}$ (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecimento a 56 °C	0,56	0,80	0,180	3,1 : 1,0
	0,49	0,80	0,194	2,5 : 1,0
	0,63	0,80	0,251	2,5 : 1,0
	0,55	0,80	0,231 ± 0,008*	2,4 : 1,0
	0,60	0,80	0,276 ± 0,020	2,2 : 1,0
	0,52	0,80	0,215 ± 0,013*	2,4 : 1,0
	0,52	0,80	0,209 ± 0,014*	2,5 : 1,0
vaporização clorofórmica a 70 °C	0,82	0,80	0,228	3,6 : 1,0
	0,95	0,80	0,283	3,4 : 1,0
	0,49	0,80	0,161 ± 0,027*	3,0 : 1,0
	0,60	0,80	0,151 ± 0,019*	4,0 : 1,0

Obs.: T_{DODAB} - Tipo de preparação de vesículas de DODAB; $[DODAB]_{mistura}$ - Concentração de DODAB na mistura; $[DMP]_{mistura}$ - Concentração de DMP na mistura; $[DMP]_{adsorvida}$ - Concentração adsorvida de DMP

*Desvio padrão obtido pela fórmula: $\delta=\{[\Sigma(x-m)^2]/n\}^{1/2}$, onde; x=concentrações na adsorção, m=média dos valores de x, n=8 (nº de dados).

**Nas condições do experimento, não foram atingidos os valores máximos de adsorção de DMP sobre vesículas de DODAB. Para isto, seriam necessárias concentrações de DMP de pelo menos 2 vezes a concentração de DODAB em cada situação.

4.1.4 - Efeito do NaBr 5 mM

O efeito da força iônica na interação DODAB/DMP, utilizando NaBr 5 mM está descrita na Tabela 4.4 e Figuras 4.2A e 4.2B. Não houve formação do complexo nesta condição. Na Tabela 4.4, pode-se observar que o sal influiu na interação, dificultando a formação do complexo DODAB/DMP. Nas Figuras 4.2A e 4.2B, a adsorção do nucleotídeo sobre a bicamada catiônica foi próxima de zero. Isto mostrou a importância da atração eletrostática entre nucleotídeo carregado negativamente e a membrana carregada positivamente na complexação e o efeito da força iônica de 5 mM de NaBr afetando esta complexação. O potencial zeta para vesículas grandes de DODAB preparadas em água foi de 58 mV, enquanto para as mesmas vesículas preparadas em NaBr 5 mM foi de 6 mV (Nascimento, D.B. et al., 1998), explicando o substancial efeito de uma força iônica relativamente pequena (como é a solução NaBr 5 mM) sobre a adsorção de nucleotídeo. A atração eletrostática entre o nucleotídeo e a bicamada catiônica tornou-se bastante pequena para um potencial zeta de +6 mV sobre a membrana. Este resultado mostrou a importância da atração eletrostática na formação do complexo lipossomo/nucleotídeo em água.

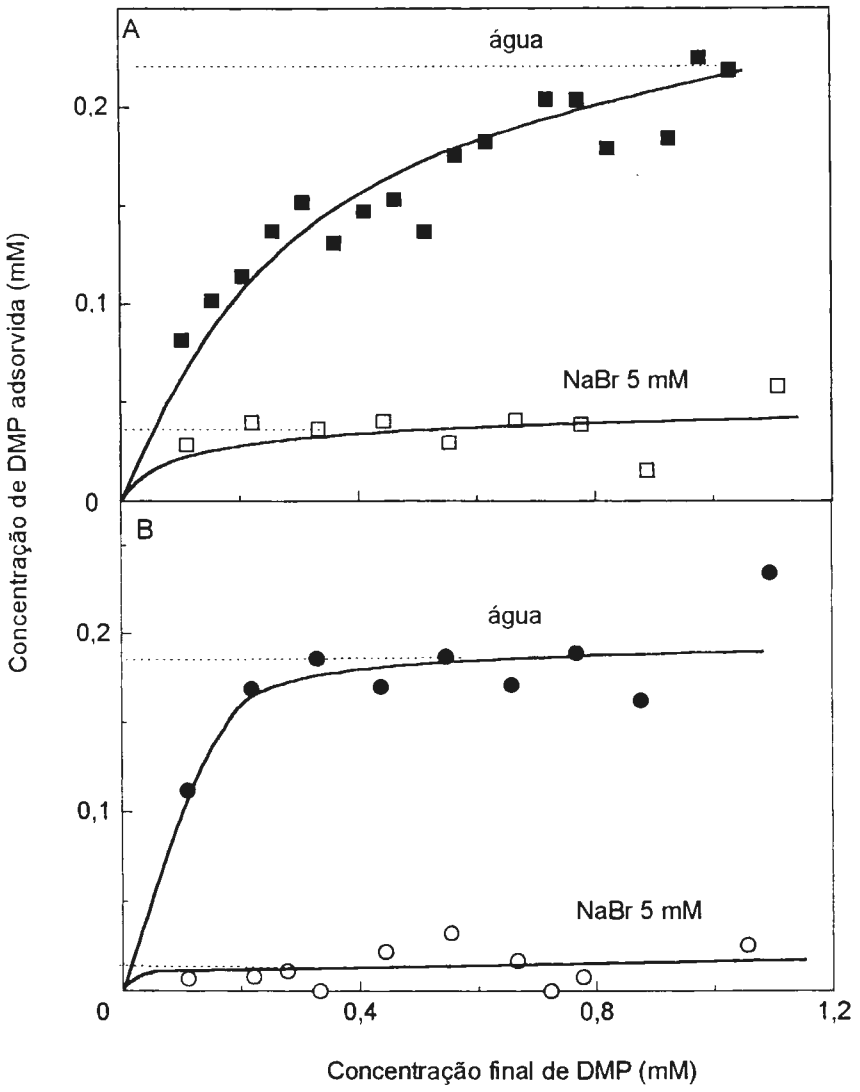


Figura 4.2 - Efeito do NaBr 5 mM na adsorção de DMP sobre vesículas grandes de DODAB obtidas por aquecimento e em água (■) e em NaBr 5 mM (□) ou por vaporização clorofórmica em água (●) e em NaBr 5 mM (○). Concentração final de DODAB em cada mistura = 0,5 mM.

Tabela 4.4 - Proporção molar DODAB/DMP quando nucleotídeo foi adicionado em vesículas preparadas em solução de NaBr 5 mM e interação à 37 °C

Tipo de preparação de vesícula	[DODAB] na mistura (mM)	[DMP] na mistura (mM)	Conc. adsorvida de DMP (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecida	0,55	0,80	0,01	55,0 : 1,0
injetada	0,31	0,80	0,01	31,0 : 1,0

Devido à dificuldade de interação DODAB/nucleotídeo, estudou-se a influência dos íons durante a preparação do lipossomo, isto é, vesículas de DODAB foram preparadas em diluente contendo nucleotídeo e íons. Verificou-se que mais nucleotídeo conseguira se ligar à vesícula nesta situação (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Proporção molar DODAB/DMP quando as vesículas foram preparadas em solução de DMP e NaBr 5 mM

Tipo de preparação da vesícula de DODAB	[DODAB] na mistura (mM)	[DMP] na mistura (mM)	Conc. adsorvida de DMP (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecida	0,49	0,80	0,076 ± 0,010	6,4 : 1,0
	0,38	0,80	0,116 ± 0,013	3,3 : 1,0
injetada	0,40	0,80	0,099 ± 0,006	4,0 : 1,0
	0,40	0,80	0,086 ± 0,011	4,7 : 1,0

Íons brometo e DMP competiram por sítios de ligação na vesícula, porém, as forças de ligação vesícula-brometo foram bem mais fortes que as forças de interação com o nucleotídeo, impedindo até o deslocamento do contraíon. Observou-se também que, dispersões de DODAB em presença de sal eram menos estáveis que as dispersões em água, ocorrendo floculação em algumas horas e quanto mais concentrada a dispersão de DODAB, mais rapidamente ocorreu a floculação e ainda, preparações por aquecimento a 56 °C mostraram-se menos estáveis que as preparações obtidas por vaporização clorofórmica a 70 °C

4.1.5 - Efeito da solução de D-Glicose 0,264 M

A Tabela 4.6 mostra que em presença de D-Glicose ocorreu a complexação DODAB/DMP. Já foi observado também que a D-Glicose adsorve nessas vesículas catiônicas. A confirmação desse resultado dependeria da obtenção de uma isoterma de adsorção em D-Glicose.

Tabela 4.6 - Proporção molar DODAB/DMP em misturas preparadas em solução 0,264 M de D-Glicose (adição de DMP a vesículas prontas), com interação à 37 °C, com concentração de DMP de 0,80 mM na mistura

Tipo de preparação de vesícula de DODAB	[DODAB] na mistura (mM)	[DMP] adsorvido (mM)	Proporção molar DODAB:DMP
aquecida	0,56	0,258 ± 0,014	2,2 : 1,0
	0,56	0,262 ± 0,011	2,2 : 1,0
injetada	0,50	0,249 ± 0,010	2,0 : 1,0
	0,50	0,279 ± 0,011	1,8 : 1,0

*Desvio padrão obtido pela fórmula: $\delta=\{[\Sigma(x-m)^2]/n\}^{1/2}$, onde; x=concentração de DMP adsorvido, m=média dos valores de x, n=8 (nº de medidas).

A formação de complexos DODAB/DMP ocorreu simplesmente devido ao fato de D-Glicose não formar íons, isto é, por estar na forma molecular, não interferindo nas interações eletrostáticas entre DODAB e DMP.

4.1.6 - Linearização das isotermas de adsorção pelo modelo de Langmuir

A adsorção limite de DMP pode ser determinada por dois processos diferentes: (a) pelo platô da adsorção limite como determinado diretamente da curva de adsorção (Figura 4.1) e (b) por linearização das isotermas de adsorção usando o modelo de Langmuir.

Em água pura, uma concentração final de DMP de 1,0 mM na mistura DODAB/DMP resultou em cerca de 0,25 mM de DMP adsorvido em 0,50 mM de DODAB, resultando em uma proporção molar de DODAB:nucleotídeo de cerca de 2:1 na adsorção limite e que foi obtida por ambos os processos citados: (a) pelas curvas de adsorção (Figura 4.1, pontos

definidos pelas linhas pontilhadas) e (b) pelo processo de linearização das isotermas de adsorção (Tabela 4.8).

Tabela 4.7 - Exemplo de linearização de uma isoterma de adsorção pelo modelo de Langmuir

X = c = $C_{sobrenadante}$ (mM)	$C_{adicionado}$ (mM)	$C_{adsorvido}$ (mM) = $C_{adicionado}$ - $C_{sobrenadante}$	x/m = nº moles de DMP adsorvido/nº moles de DODAB	Y = c/(x/m)
0	0	0	-	-
0,021	0,105	0,084	0,175	0,120
0,035	0,210	0,175	0,365	0,096
0,125	0,315	0,190	0,396	0,316
0,242	0,420	0,178	0,371	0,652
0,369	0,525	0,156	0,325	1,135
0,443	0,630	0,187	0,390	1,136
0,668	0,840	0,172	0,358	1,866
0,883	1,050	0,167	0,348	2,537
1,077	1,260	0,183	0,381	2,827
1,314	1,470	0,156	0,325	4,043
1,503	1,680	0,177	0,369	4,073
1,699	1,890	0,191	0,398	4,269
1,854	2,100	0,246	0,513	3,614

A equação da reta obtida através do ajuste do programa Origin 5.0 foi :

$$Y = 0,146 + 2,41X$$

Pode-se observar que a linearização pelo modelo de Langmuir foi possível e que a constante a da reta obtida: Y = aX + b, forneceu diretamente a proporção molar máxima para adsorção do nucleotídeo ao DODAB (Tabela 4.8).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Tabela 4.8 - Equações de retas obtidas pela linearização das isotermas de adsorção

Tipo de preparação de vesículas de DODAB	Equações das retas obtidas
aquecida	Y=0,211+2,0X
	Y=0,031+2,3X
	Y=0,236+2,2X
	Y=0,279+2,1X
injetada	Y=0,010+2,3X
	Y=0,111+2,6X
	Y=0,111+3,0X
	Y=0,176+2,4X
	Y=0,310+2,3X
	Y=0,092+1,8X

Pela média dos valores tanto para vesículas obtidas por aquecimento como por vaporização em clorofórmio, pode-se dizer que a relação molar é 2 DODAB : 1 DMP.

4.2 - Efeito da concentração de NaCl sobre velocidade de floculação de vesículas de DODAB

Devido às observações de formação de floculados em alguns casos, fez-se um estudo do efeito da concentração de sal sobre a velocidade de floculação de vesículas de DODAB. Porém, foi utilizado cloreto de sódio por ser constituinte da solução fisiológica que é utilizada em experimentos com organismos vivos. Vide item 3.2.8 em Materiais e Métodos.

Foram preparadas soluções com concentrações crescentes de NaCl e para manter a osmolaridade, utilizou-se D-glicose como complemento por ser comum em preparações com células e por não ser um constituinte iônico, não interferindo no estudo considerado. A osmolaridade fixada foi a referente à mais alta concentração de NaCl que seria testada (0,250 mM).

As dispersões de DODAB foram preparadas em solução de D-Glicose (0,511 mM) para evitar choque osmótico quando adicionadas às soluções de NaCl para preparar as misturas.

Foram determinadas curvas de turbidez em 400 nm em função do tempo para obter a velocidade inicial de floculação induzida por soluções salinas isoosmóticas. A Tabela 3.7 de Materiais e Métodos mostra o esquema de preparação das soluções isoosmóticas da mistura (0,552 Os/kg) e a Figura 4.3 mostra algumas cinéticas assim obtidas. Conforme se observou, a preparação foi relativamente estável mesmo em soluções salinas próximas às

condições fisiológicas e a floculação máxima ocorreu nas 24 horas iniciais, mantendo-se durante o período observado de uma semana, pois em 24 horas, as estruturas já tinham atingido a distância máxima permitida para o equilíbrio.

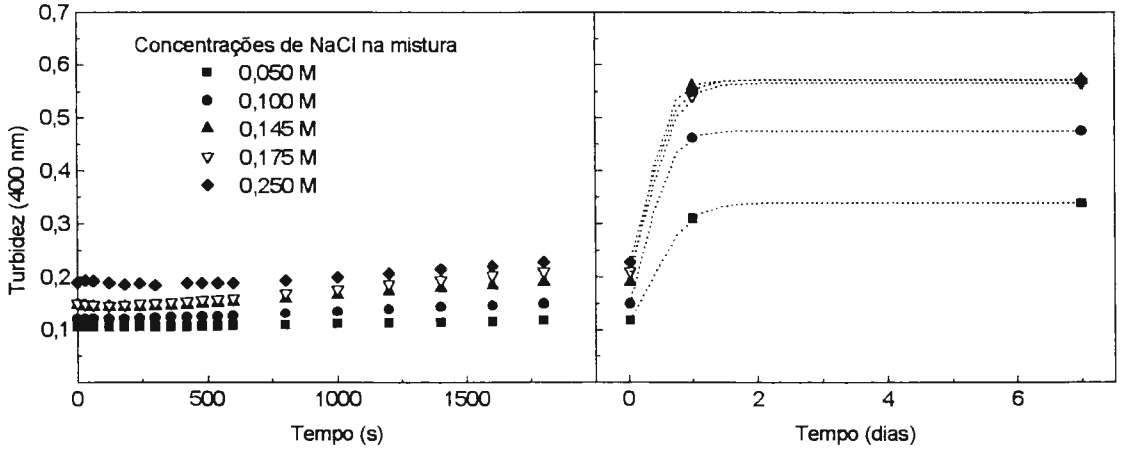


Figura 4.3 - Efeito do NaCl sobre agregação de vesículas de DODAB obtidas por aquecimento.

4.3 - Nucleotídeo como um ânion hidrofóbico de alta afinidade pelas bicamadas catiônicas em água.

Da proporção molar obtida na adsorção limite para DODAB:DMP de 2:1 (Figura 4.1), o sinal do complexo DODAB/DMP deve ser positivo. Esta previsão realmente foi confirmada pela determinação de mobilidades eletroforéticas para os lipossomos em presença de DMP como uma função da concentração de nucleotídeo (Figuras 4.5 e 4.6), contudo, quando a concentração de DMP (0,4-2,0 mM) na mistura tornou-se muito maior que a concentração de DODAB (0,08 mM), houve uma floculação induzida por DMP em vesículas grandes de DODAB (Figura 4.4A) que foi muito rápida em comparação com floculação induzida por NaCl (40-210 mM de NaCl) (Figura 4.4B). Este resultado consistentemente ilustra uma importante propriedade do nucleotídeo que se comportou como um ânion hidrofóbico que tem uma afinidade muito maior por membrana catiônica que a exibida por um ânion inorgânico pequeno como o cloreto (Cl^-). O componente hidrofóbico da interação realmente causou alta afinidade entre o nucleotídeo e a bicamada que levou à neutralização de carga

no lipossomo e floculação rápida (Figura 4.4A). Para evitar a floculação, a proporção molar DODAB:DMP teve que ser mantida a 2:1 com preservação da carga positiva do complexo. Um excesso de nucleotídeo em relação ao DODAB definitivamente causou floculação (Figura 4.4).

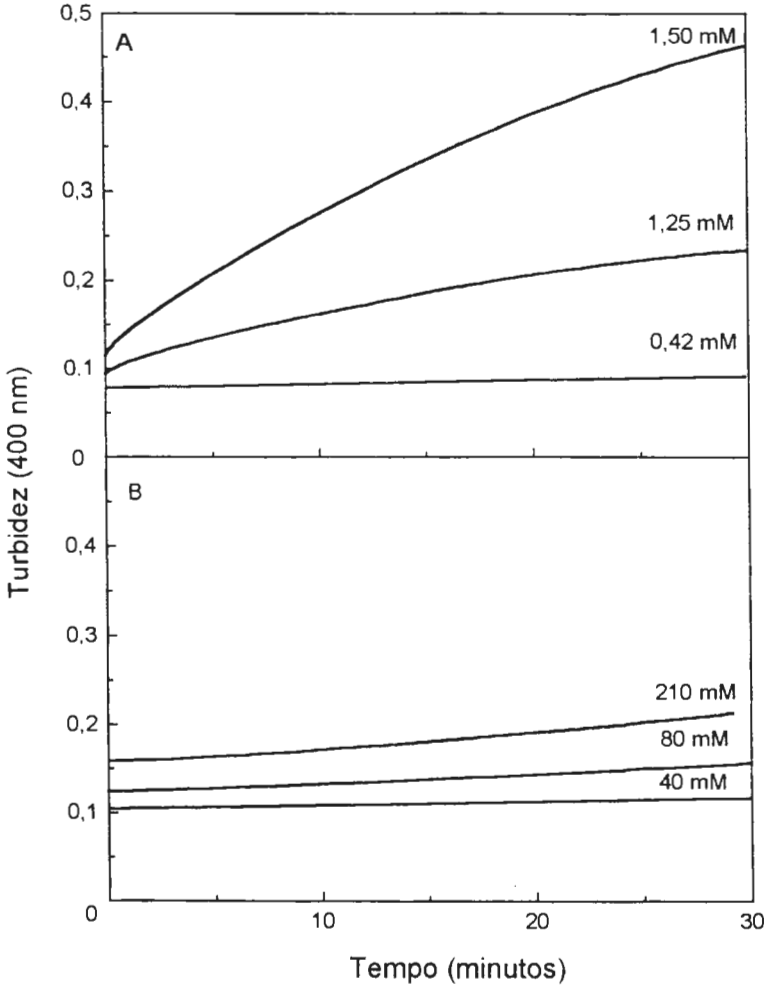


Figura 4.4 - (A) Efeito do DMP sobre turbidez nas vesículas de DODAB 0,08 mM preparadas por aquecimento em função do tempo. A concentração final de DMP na mistura está indicada no gráfico em (A) . (B) Efeito do NaCl sobre turbidez de vesículas grandes de DODAB 0,08 mM preparadas por aquecimento. Concentração de NaCl indicada no gráfico. Em (B), as vesículas foram preparadas em solução de D-Glicose 0,511 M e mesmo com adição de NaCl foi mantida a isotonicidade.

4.4 - Correlação entre mobilidade eletroforética mínima e adsorção máxima de nucleotídeo.

A técnica para determinação analítica de isotermas de adsorção requer concentrações de DODAB e DMP na faixa de concentração milimolar, enquanto a microeletroforese de vesículas requer concentrações de DODAB que sejam pelo menos 100 vezes menores que aquelas usadas para isotermas de adsorção.

Para que uma única vesícula seja submetida ao campo elétrico e sem interferência de outras vesículas carregadas na mobilidade, há necessidade de diluição infinita. Não se tem uma determinação segura de mobilidade eletroforética para uma dispersão concentrada de vesículas carregadas (Carmona-Ribeiro, AM. & Midmore, B.R., 1992a). Por isso, as mobilidades eletroforéticas para vesículas grandes de DODAB como uma função da concentração de nucleotídeo nas misturas foram obtidas com DODAB a 0,05 mM, uma concentração onde apenas algumas vesículas suficientemente afastadas e praticamente não interagindo umas com as outras estavam visíveis ao microscópio de campo escuro.

Na adsorção limite, a proporção molar DODAB/DMP adsorvida foi 2:1 (Figura 4.5A), sendo a mobilidade eletroforética para o complexo igual a $+2,5 \times 10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ (Figura 4.5B). Embora as concentrações finais de DODAB ou DMP nas misturas para isoterma de adsorção (Figura 4.5A) fossem 10 vezes maiores que aquelas para a curva de mobilidade eletroforética em função da concentração de DMP (Figura 4.5B), a proporção DODAB:DMP foi igual a 2:1 em ambas as curvas (ver linhas pontilhadas na Figura 4.5) e a adsorção máxima para o nucleotídeo sobre os lipossomos ocorreu simultaneamente à mobilidade eletroforética mínima.

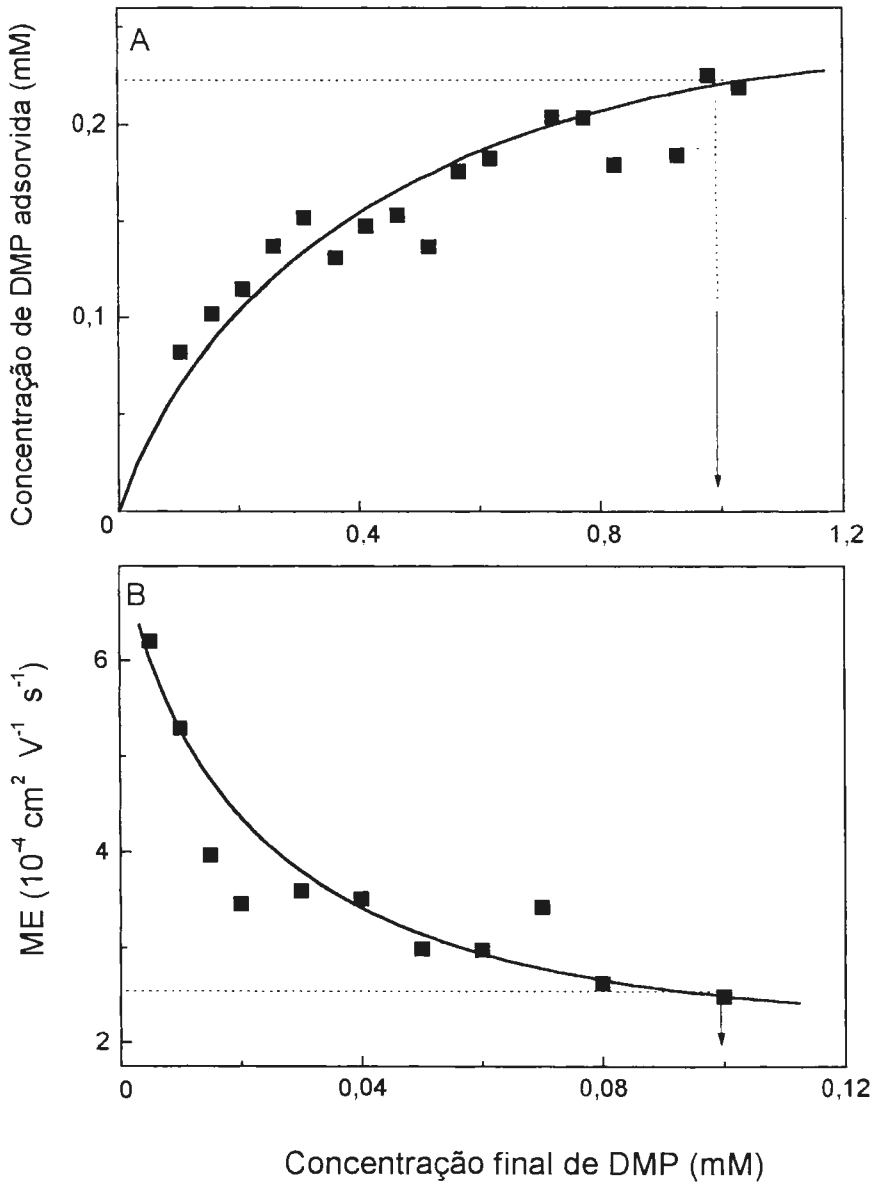


Figura 4.5 - Correlação entre ME (Mobilidade eletroforética) mínima e adsorção máxima de DMP sobre vesículas grandes de DODAB preparadas por aquecimento. Em (A), [DODAB]final = 0,5 mM e em (B) [DODAB]final = 0,05 mM. Em (A), o platô para adsorção máxima foi atingido quando [DMP] = 1,0 mM e, em (B), a mobilidade mínima foi atingida quando [DMP] = 0,1 mM.

Na Figura 4.6, a mobilidade eletroforética para vesículas grandes de DODAB em três diferentes concentrações de DODAB diminuiu como uma função da concentração de DMP nas misturas, atingindo uma mobilidade positiva mínima de 2,5 x 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ a uma concentração de DMP na mistura que foi cerca de duas vezes a concentração de DODAB em cada mistura. Deve-se considerar que as isotermas de adsorção apontaram para uma proporção molar de 2:1 (DODAB/DMP adsorvido) precisamente quando uma proporção molar de 1:2 (DODAB/DMP adicionada) ocorreu (Figura 4.1 e 4.5A).Novamente, um valor de mobilidade positiva foi consistente com a proporção molar de 2:1 (DODAB/DMP adsorvida).

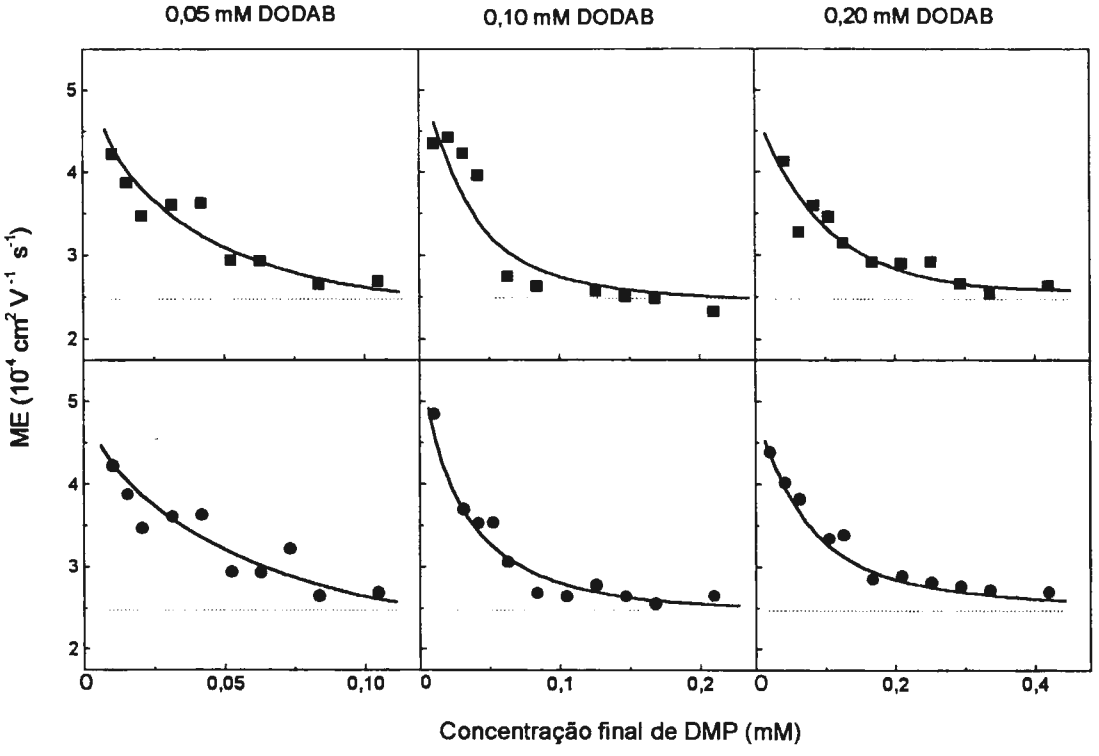


Figura 4.6 - Mobilidades Eletroforéticas (ME) de vesículas grandes de DODAB em função de concentrações de DMP. Nas misturas foram consideradas 3 concentrações de DODAB (0,05 - 0,10 e 0,20 mM) e 2 tipos de preparação de vesículas: (■) por aquecimento e (●) por vaporização clorofórmica. As linhas pontilhadas indicam valores mínimos (~2,5 x 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) de ME. Em cada caso, o valor mínimo ocorreu quando a concentração de DMP foi aproximadamente 2 vezes a concentração de DODAB na mistura.

Para calcular a densidade superficial de carga do complexo DODAB/DMP, primeiramente foi feita a conversão de Mobilidade Eletroforética (ME) das partículas para Potencial Zeta (ζ), utilizando a teoria de O'Brien e White (1978).

Por esta teoria, a mobilidade de partículas coloidais de quaisquer formas é independente das propriedades dielétricas da partícula e condições eletrostáticas da superfície da partícula. A mobilidade depende apenas do tamanho e forma, das propriedades da solução eletrolítica em que está suspensa e carga interna (O'Brien, R.W. & White, L.R., 1978) (Carmona-Ribeiro, A.M. & Midmore, B.R., 1992).

A equação completa de Poisson-Boltzmann (PB) para o potencial de superfície sobre uma esfera relaciona o potencial de superfície com o raio da partícula e a concentração de eletrólito (White, L.R., 1977). Para calcular a densidade superficial de carga a partir do potencial zeta do complexo foi usada uma aproximação analítica sugerida por Wiersema, Loeb e Overbeek (1966):

$$\sigma = -\epsilon\ (kT/ze)\ \kappa\ \{2[\sinh \zeta ze / (2kT)] + (4/\kappa a)\ [\tanh \zeta ze / (4kT)]\}$$ **(equação 4.4.1)**

onde:

σ = densidade de carga (em $\mu C/cm^2$),

ζ = potencial zeta (em Volts),

a = raio da vesícula igual a $D_z/2$ (em cm),

κ = inverso do comprimento de Debye (em cm^{-1})

A expressão final para a densidade de carga a 25 °C foi dada pela equação 4.**4**.2 (Carmona-Ribeiro, A.M. & Midmore, B.R., 1992):

$$\sigma = -5{,}87\ c^{1/2}\ (1/z)\ \{[2 \sinh (19{,}46\xi)] + [4/\kappa a] \tanh (9{,}73\zeta)\}$$ **(equação 4.4.2)**

onde:

σ = densidade de carga (em $\mu C/cm^2$)

ζ = potencial zeta (em Volts)

a = raio da vesícula (em cm)

c = concentração de nucleotídeo (em molar)

z = carga do contraíon

Assim, as etapas seguidas para cálculo da densidade supericial de carga a partir do potencial zeta do complexo foram:

a) Cálculo de Potencial Zeta (ζ):

$\zeta = y_0 \times 0{,}0257$ **(equação 4.4.3)**

y_0 foi determinado pelos gráficos em função da Mobilidade reduzida (E) e de κa .

Então, foi determinada a Mobilidade Reduzida (E) (O'Brien, R.W. & White, L.R., 1978) pelo valor medido da Mobilidade Eletroforética (ME) na diluição infinita:

$E = 0{,}7503 \times 10^4 \times ME$ **(equação 4.4.4)**

Em seguida, foi calculado valor de κa (O'Brien, R.W. & White, L.R., 1978), sendo que:

$\kappa a = (32{,}83 \times 10^6 \times c^{1/2}) \times a$ **(equação 4.4.5)**

onde: c = concentração de DMP ou nucleotídeo (em Molar) e,
a = raio da vesícula (em cm).

Assim, através de gráficos de Mobilidade Reduzida (E) e de κa em função de y_0, foi determinado o valor de y_0 (O'Brien, R.W. & White, L.R., 1978) que foi aplicado na equação 4.4.3 e obtido o valor do Potencial Zeta (ζ).

b) Finalmente, para calcular a densidade superficial de carga a partir do potencial zeta do complexo foi usada a aproximação analítica sugerida por Loeb, Wiersema e Overbeek e a expressão final para a densidade de carga a 25 °C dada pela equação 4.4.2

Tabela 4.9 - Determinação de densidade superficial de carga e da relação cargas/monômero de DODAB para duas forças iônicas (0,1 e 0,03 mM de DMP).

[DODAB] (mM)	diâmetro da vesícula (nm)	[DMP] (mM)	Proporção molar DODAB:DMP	κa	ME ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	E ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	ζ (Volts)	σ ($\mu C/cm^2$)	cargas/monômero de DODAB
0,05	500	0,10	1:2	8,2	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	0,033	0,063	0,002
0,05	500	0,03	2:1	5,8	$4,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	0,090	0,002	0,008

No complexo DODAB-DMP não ocorreu neutralização de cargas conforme pôde ser observado pelos experimentos de mobilidade eletroforética, em que foi atingido um valor mínimo, porém, positivo quando a adsorção de DMP foi máxima e correspondeu à proporção molar 2 DODAB : 1 $DMP_{adsorvido}$.

A proporção molar DODAB:DMP de 2:1 não se deveu às hidroxilas ionizadas do fosfato do nucleotídeo mas devido à inserção do DMP na bicamada lipídica.

Pela Tabela 4.9, vê-se que existe uma densidade de carga positiva por monômero de DODAB de 0,002 a 0,008, indicando que a maioria do anfifílico permaneceu na forma associada a seu contraíon e que somente uma pequena porcentagem estava dissociada, na forma catiônica.

O mesmo ocorreu com a interação entre DODAB e DNAs, conforme será visto adiante.

4.5 - Inserção hidrofóbica de nucleotídeo na bicamada catiônica

Uma questão que surge neste ponto é: por que na adsorção máxima haveria apenas uma molécula de DMP para 2 moléculas de DODAB no complexo?

Se a complexação fosse apenas por atração eletrostática, a proporção molar deveria ser de 1:1 pois o meio em que o nucleotídeo estava solubilizado era a água e o pH deste meio era em torno de 6,2 e neste valor de pH, apenas um próton estaria dissociado da molécula de DMP (Macarulla, J. M. & Marino, A; 1988) apesar de se ter dois sítios no fosfato do DMP passíveis de dissociação, então, uma explicação plausível para a proporção molar obtida seria a ocupação de duas moléculas de DODAB por um nucleotídeo inserido na bicamada com o fosfato interagindo com uma cabeça catiônica de DODAB adjacente e a porção base nitrogenada do nucleotídeo interagindo hidrofobicamente com as cadeias hidrocarbônicas de DODAB. Este modo de interação explicaria consistentemente todos os

resultados descritos anteriormente, incluindo aqueles que descrevem o comportamento do nucleotídeo como o esperado para um ânion hidrofóbico.

4.5.1 - Eficiência de incorporação de vesículas de DODAB em função da [DODAB]

Na tentativa de obter uma curva de eficiência de incorporação de sacarose radioativa em vesículas de DODAB preparadas por aquecimento segundo método do item 3.2.12 de Materiais e Métodos, foram obtidos os resultados da Tabela 4.10 e curva de eficiência da Figura 4.7. A Tabela 4.10 apresenta resultados de 2 experimentos (A e B) realizados independentemente, sendo obtenção de eficiências de incorporação de vesículas de DODAB em função do aumento das concentrações do anfifílico. E na Figura 4.7, os mesmos resultados estão representados graficamente.

Tabela 4.10 - Eficiência de incorporação (E) de vesículas de DODAB obtidas por aquecimento

	[DODAB] (mM)	E (L/mol)
Experimento A	1,72	13,95
	3,44	18,63
	4,99	12,48
	6,38	13,03
	8,11	9,26
Experimento B	2,87	19,09
	5,96	39,56
	9,02	26,58
	12,43	43,35*
	15,11	28,64*

*formação de gel, enquanto outras amostras estavam na forma solúvel.

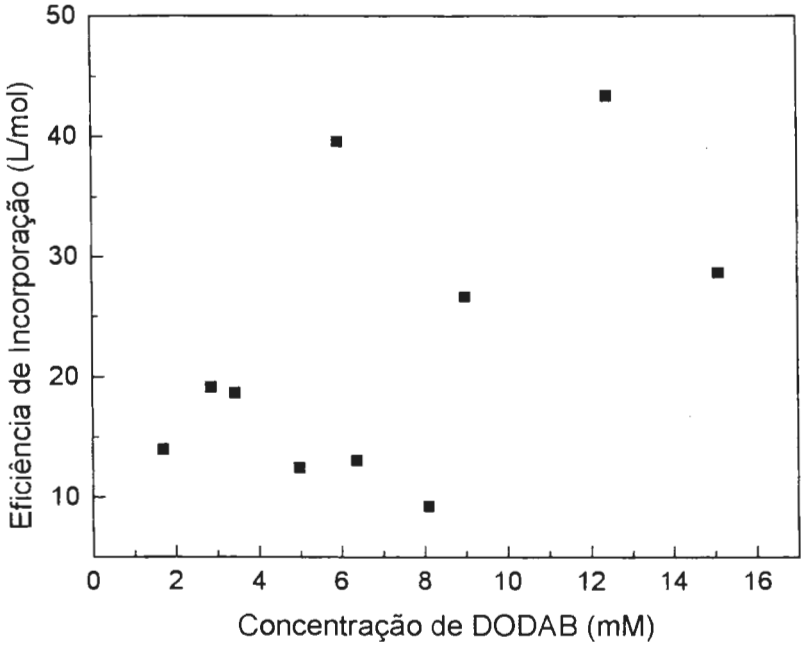


Figura 4.7 - Eficiência de incorporação de sacarose radioativa em vesículas de DODAB obtidas por aquecimento.

A partir das concentrações de 12 mM houve formação de um gel viscoso e isto pode ter aumentado os valores de "E". Conforme pode ser visto na Figura 4.7, os pontos do gráfico ficaram muito dispersos talvez devido ao erro inerente à técnica utilizada (diálise em "saquinhos"). Porém, quando dados da Tabela 4.10 e 4.11 referentes à concentração de DODAB próxima a 5 mM são comparados, pode-se notar que os valores de eficiência de incorporação são próximos, mostrando a validade para demais concentrações de DODAB analisados na Tabela 4.10, apesar dos valores de "E" estarem mais dispersos.

Tabela 4.11 - Eficiência de Incorporação (E) de sacarose sobre vesícula de DODAB obtida por vaporização clorofórmica

	[DODAB] (mM)	E (L/mol)
DODAB aquecida	5,2*	15,5 ± 5,7
	7,9*	41 ± 0,6
DODAB injetada	5**	19

(*)dados obtidos de Tsuruta, L.R. et al., 1997, (**)dados obtidos de Nascimento, D. et al., 1998.

4.5.2 - Ruptura de vesículas unilamelares grandes de DODAB induzida por nucleotídeo

Dos experimentos de ruptura vesicular, houve uma ruptura de vesículas grandes de DODAB induzida por DMP igual a 85-100%, em contraste com ruptura espontânea de lipossomo (sem adição de DMP) de 57-82% (Tabela 4.12). Estes experimentos ofereceram mais uma evidência a favor da hipótese de inserção de nucleotídeo na adsorção máxima. Além disso, a adsorção de DMP foi determinada para vesículas preparadas diretamente em uma solução de DMP na condição de adsorção máxima. A proporção molar DODAB:DMP assim obtida foi 2:1, confirmando a hipótese da inserção de nucleotídeo. De fato, se a inserção de nucleotídeo ocorreu, não interessa se ocorreu no compartimento interno da vesícula ou por fora da vesícula: a adsorção máxima foi a mesma.

A inserção de DMP na bicamada catiônica é ilustrada na Figura 4.8. A uma proporção molar baixa de DODAB:DMP, a Figura 4.8a mostra uma vista superior da interação iônica entre a cabeça polar de fosfato do DMP e a cabeça polar catiônica do DODAB, com a porção aromática no espaço entre as cadeias hidrocarbônicas adjacentes. A seção transversal (Figura 4.8b) mostra que a largura do espaço não está completamente preenchida ao longo de toda a extensão das cadeias hidrocarbônicas, gerando um defeito na estrutura da bicamada. Na adsorção limite, quando a proporção DODAB:DMP 2:1 para o complexo é atingido, a inserção do nucleotídeo na bicamada poderia dar um arranjo regular como os mostrados nas Figuras 4.8c e 4.8d. Nesta representação, na superfície da membrana, deve-se notar que o espaço ocupado pelas cabeças do lipídio e do nucleotídeo é similar. No nível mais interno da bicamada, a seção transversal ilustra os espaços na bicamada que resultam da inserção de cada molécula de DMP (figura 4.8d). Isto pode explicar a saída do conteúdo interno lipossomal obtida nos ensaios de ruptura lipossomal (Tabela 4.12). Deve-se notar que a hipótese de inserção de nucleotídeo gera com sucesso configuração molecular da energia mínima que respeita o fato de duas moléculas não ocuparem o mesmo lugar no espaço físico. Assim, temos a configuração do nucleotídeo inserido na membrana que foi obtida por minimização de energia, originando as estruturas na Figura 4.8.

Tabela 4.12 - Ruptura vesicular induzida por DMP mediada por diálise convencional (% Rd) ou por diálise de equilíbrio (%Re)

Concentração final de DODAB (mM)	Concentração final de DMP (mM)	Rd (%)	Re(%)
0,5	0	57	-
0,5	1,0	85	-
2,0	0	82	-
2,0	3,2	100	-
0,5	0	-	74
0,5	1,0	-	93

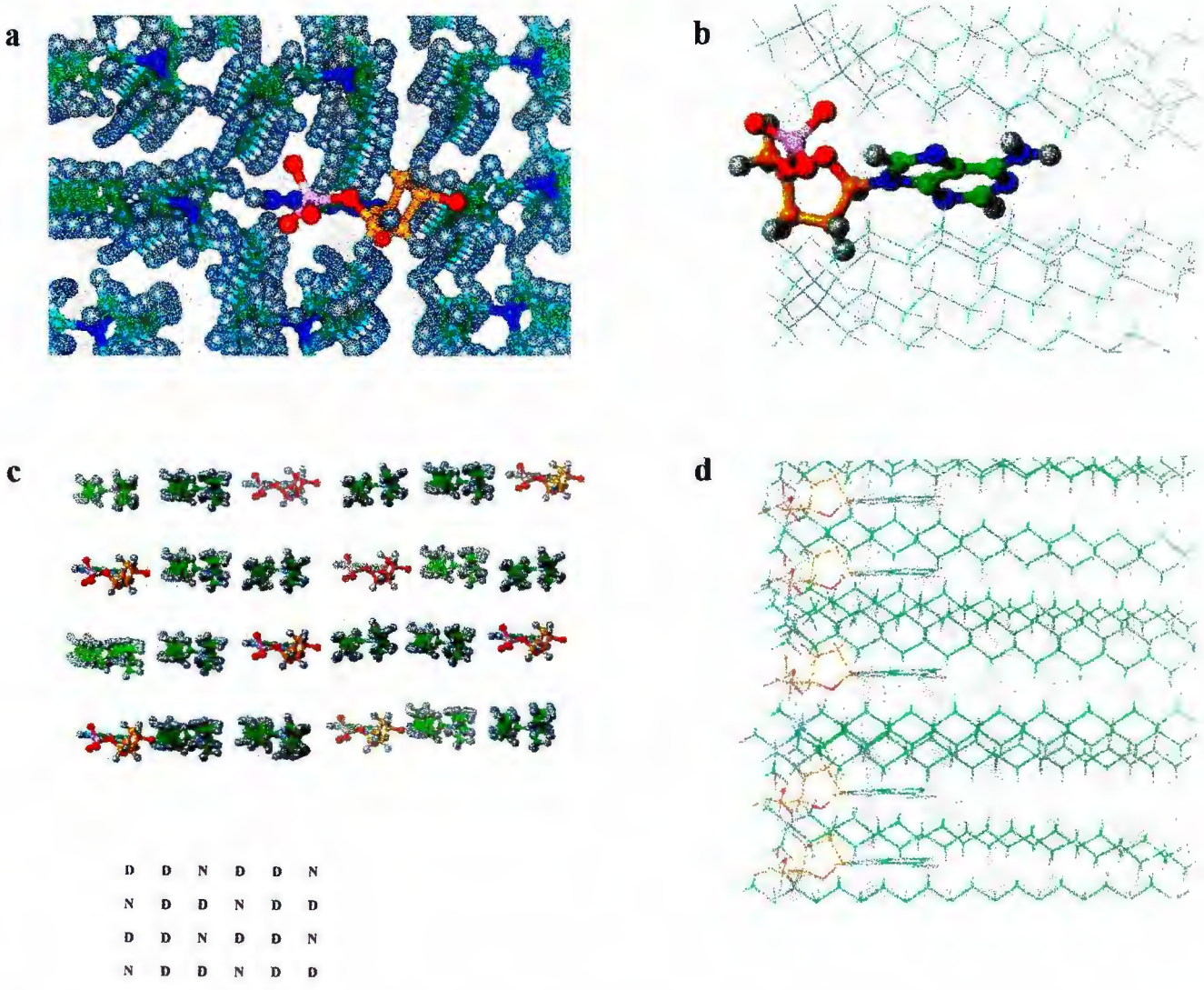


Figura 4.8 - Representações tri-dimensionais do complexo nucleotídeo/DODAB obtidos por minimização de energia. (a) Vista superior, abaixo da adsorção máxima. (b) Secção transversal, abaixo da adsorção máxima. (c) Vista superior em adsorção máxima de nucleotídeo (observar a proporção molar DODAB:DMP igual a 2:1), onde D=DODAB; N=nucleotídeo. (d) Secção transversal no máximo de adsorção de nucleotídeos. Para maior clareza, os átomos de carbono das riboses foram representados em cor laranja.

4.6 - Mobilidade eletroforética positiva para o complexo DODAB/DNA

Para o experimento de mobilidade eletroforética de partículas DNA/DODAB foram utilizadas vesículas de DODAB obtidas por sonicação. Por serem vesículas pequenas (SUV), não foi possível visualizá-las ao microscópio óptico acoplado ao aparelho de medição de mobilidade eletroforética (Carmona-Ribeiro, AM. & Midmore, B.R., 1992b). O DNA também não pode ser visualizado através deste microscópio por estar solubilizado em água, porém, ao interagir com as vesículas de DODAB, houve formação do complexo e as partículas globulares de DNA/DODAB puderam ser visualizadas ao microscópio óptico devido ao DNA mudar sua conformação de fita para glóbulo.

Em concentrações mais baixas de DODAB, a mobilidade eletroforética apresentou um valor mínimo e negativo. Com aumento da concentração de vesículas, tendeu a um patamar de mobilidade eletroforética positiva (Figura 4.9). Quanto maior a concentração de DNA, maior a concentração de vesículas sonicadas para atingir o patamar. Efeitos semelhantes ocorreram para os 2 tipos de DNA testados : λ e T4 (Figuras 4.9 e 4.10).

Na Figura 4.9, são apresentadas as curvas obtidas da interação entre vesículas pequenas de DODAB (SUV) e DNA do fago λ e neste caso, não foi possível precisar o valor da ME mínima para a concentração de $1,92 \times 10^{-12}$ M de DNA (ou 0,308 μM em nucleotídeo). Porém, para a concentração de $3,84 \times 10^{-12}$ M de DNA (ou 0,912 μM em nucleotídeo), o valor mínimo de ME de DODAB/DNA foi -4×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ e o máximo foi $+4 \times 10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$. Neste último caso, há uma proporção molar DODAB:DNA (em nucleotídeos) de cerca de 10:1. Mas, o erro envolvido nessa determinação foi grande porque o λ DNA foi o menor DNA aqui analisado e os glóbulos formados também foram os menores, tornando maior a dificuldade em visualizá-los.

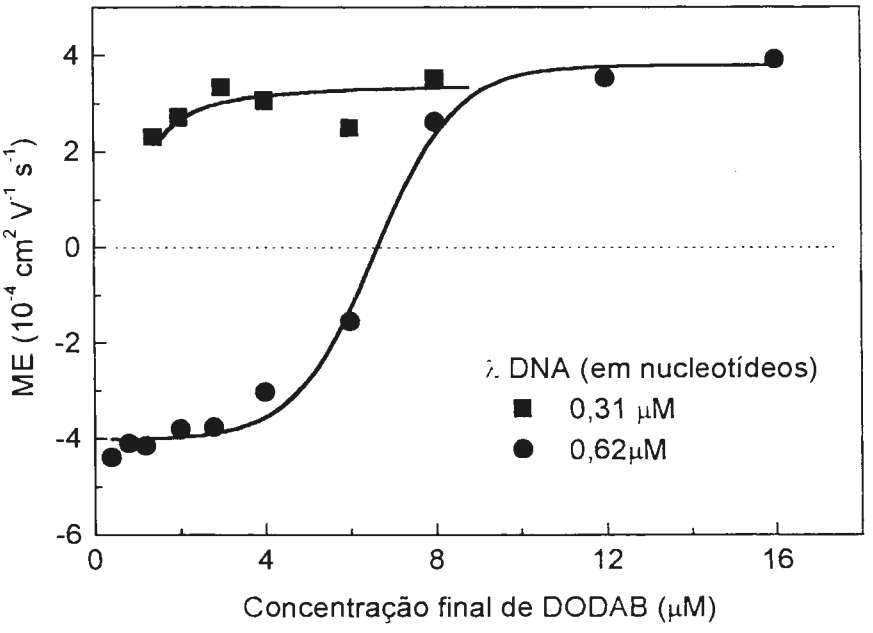


Figura 4.9 - Mobilidade eletroforética (ME) para partículas das misturas DNA-vesículas pequenas de DODAB como uma função da concentração de DODAB para 2 diferentes concentrações de λ DNA (em nucleotídeos).

A Figura 4.10 mostra a mobilidade eletroforética (ME) de complexos DNA/DODAB em função de concentração final de DODAB para uma concentração fixa de T4 DNA em 3 diferentes concentrações de T4 DNA. Os valores mínimos de mobilidade eletroforética (-2 x 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) coincidiram nas 3 concentrações testadas de DNA e os valores máximos de mobilidade eletroforética também (+2 x 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$). Para a obtenção destes valores máximos ocorreu que quanto menor foi a concentração de DNA, menor a concentração de DODAB necessária para neutralização do complexo. Neste caso, a proporção DODAB : DNA (em nucleotídeos) no ponto de neutralização foi aproximadamente 2:1. Por exemplo, para 1,82 μM de T4 DNA (em nucleotídeos), obteve-se a neutralização em torno de 5 μM de DODAB e para 0,46 μM de T4 DNA, obteve-se a neutralização em torno de 1 μM de DODAB.

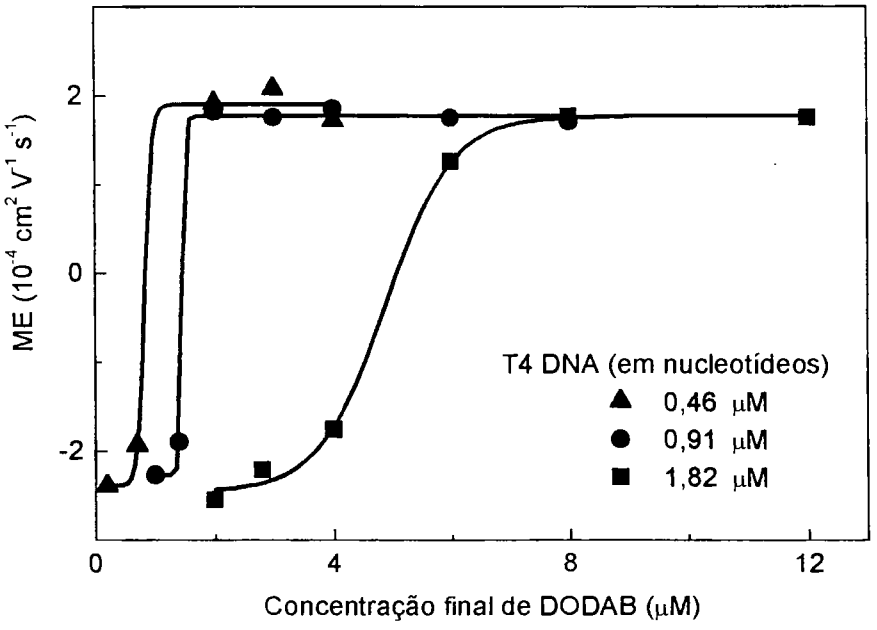


Figura 4.10 - Mobilidade eletroforética (ME) para partículas das misturas DNA-vesículas pequenas de DODAB como uma função da concentração de DODAB para 3 diferentes concentrações de T4 DNA (em nucleotídeos).

A visualização da partícula foi difícil e fácil, respectivamente, abaixo e acima da carga de neutralização (ME=0). Na microscopia de campo escuro, a visualização atribuiu à partícula um diâmetro maior que 0,15 μm. De fato, tamanhos de cerca de 1,0 μm foram relatados para DNA T4 globular formado com adição de uma concentração final de 0,1 mM de brometo de cetiltrimetilamônio (Minagawa, K. et al., 1995).

Na Tabela 4.13 estão apresentadas concentrações de DODAB requeridas para ME=0 (neutralização de carga para o complexo) em 3 diferentes concentrações de T4 DNA. Embora a quantidade de DODAB requerida aumentasse com a concentração de DNA, a proporção molar permaneceu aproximadamente constante e igual a 2:1 DODAB:DNA (concentração de DNA em nucleotídeos).

A Figura 4.10 é interessante porque permite uma interpretação: é necessário adicionar pelo menos 2 bicamadas de DODAB para neutralizar ambas as fitas de uma molécula simples de DNA dupla fita. Por que isto ocorre? Simplesmente porque, inicialmente, a atração eletrostática poderia estar dirigindo o recobrimento de uma fita de DNA com uma bicamada de DODAB. Assim, o primeiro passo da interação levaria a um

intermediário igual a DNA dupla hélice eletrostaticamente ligada a uma bicamada em cada fita. Contudo, este primeiro arranjo não é estável, a bicamada é destruída, as duas fitas do DNA helicoidal são separadas e forma-se um glóbulo onde a carga total é zero (neutralização de carga). Uma quantidade de DODAB equivalente a uma das duas bicamadas de DODAB deve ser expelida do complexo para obter ME=0 e a formação de glóbulos.

Portanto, em ambos os casos (DNA do fago T4 e de λ), o complexo DODAB/DNA formado no início (concentrações mais baixas de DODAB) tinha caráter negativo que passou para um caráter neutro e depois, caráter positivo.

As proporções molares de DODAB:DNA em que houve neutralização de cargas no complexo estão na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Proporções molares DODAB:DNA na situação de neutralização de cargas

Tipo de DNA	Concentração final de DNA na mistura (em nucleotídeo) (μM)	Concentração final de DODAB quando ME=0 (neutro) (μM)	Proporção molar DODAB:DNA
T4	0,5	1,0	2,0 : 1
	0,9	1,5	1,7 : 1
	1,8	5,0	2,8 : 1
λ	0,3	1,0 (estimado)	3,3 : 1
	0,6	6,5	10,8 : 1

Os valores de densidade superficial de carga para os complexos DODAB/DNAs nas condições de ME máxima para algumas concentrações de DODAB e de DNAs foram calculados pela equação 4.4.2 e pelos dados das Figuras 4.9 e 4.10 e os resultados estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.14 - Determinação de densidade superficial de carga, da relação cargas/monômero de DODAB nos complexos DODAB/DNAs

[DODAB]* (μM)	[T4 DNA]** (μM)	[λ DNA]** (μM)	Proporção molar DODAB:DNA	κa	ME (10^{-4} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	E (10^{-4} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	ξ (Volts)	σ (μC/cm^2)	cargas/monômero de DODAB
2,5	0,46	-	5,4:1	0,22	2,0	1,5	0,039	0,076	0,0029
5	0,91	-	5,5:1	0,32	2,0	1,5	0,039	0,059	0,0020
10	0,46	-	21,8:1	0,45	2,0	1,5	0,039	0,093	0,0035
10	0,91	-	11,0:1	0,45	2,0	1,5	0,039	0,093	0,0035
10	1,82	-	5,5:1	0,45	2,0	1,5	0,039	0,093	0,0035
10	-	0,31	32,3:1	0,45	4,0	3,0	0,082	0,020	0,0008
10	-	0,62	16,1:1	0,45	4,0	3,0	0,082	0,020	0,0008

*Diâmetro das vesículas - 86 nm.

**Concentração de DNAs em nucleotídeos.

Assim como na Tabela 4.9, a Tabela 4.14 apresenta densidades de carga/monômero de DODAB que variam de 0,0008 a 0,0040, indicando também que a maioria dos anfifílicos permaneceu associado e que somente uma pequena porcentagem estava dissociada, na forma catiônica, porém, a visualização das partículas formadas pelos complexos λ DNA e DODAB são muito pequenos, levando a erros maiores. Aqui também, supõe-se que as forças eletrostáticas poderiam ser as forças dirigidoras da atração entre os grupos fosfato do DNA e cabeça catiônica do anfifílico e as forças que manteriam o complexo formado seriam as resultantes da interação hidrofóbica entre as caudas hidrocarbônicas dos anfifílicos e bases nitrogenadas dos nucleotídeos.

4.7 - Caráter globular de complexos DODAB/DNA por turbidimetria e lei de Joebst

A detecção e estimativa dos tamanhos dos glóbulos nas misturas DNA/DODAB foram baseadas na aplicação da lei de Joebst . Esta lei descreve que partículas esféricas ao serem submetidas à incidência de luz cujo comprimento de onda é próximo ao tamanho destas partículas mostra um comportamento em que existe uma relação linear entre o espalhamento da luz (turbidez) e λ^{-2}, conforme equação a seguir:

$A = (5{,}984/n_0^2)(dn/dc)^2 q^2 \nu R^{-2} \lambda^{-2}$ **(equação 4.20.1)**

Onde:

dn/dc – incremento do índice de refração específico

n_0 – índice de refração do meio

q – massa anidra da partícula irradiada

ν - número de partículas por unidade de volume

λ - comprimento de onda da luz incidente

Misturas de DODAB/DNA foram preparadas a uma proporção molar acima de 2:1, isto é, acima da neutralização de carga para o complexo. Para este grupo de experimentos, apenas DODAB SUV foi usado e este critério foi empiricamente estabelecido pela visualização de partículas por incidência de luz na microeletroforese de campo escuro no aparelho Rank Brothers no ponto de neutralização de carga para o complexo. Concentrações finais para DODAB e DNA (em nucleotídeos) nas misturas foram 0,5 e cerca de 0,1 mM, respectivamente (vide Tabela 4.15). A mistura foi incubada (30 minutos/37 °C) e espectros de turbidez foram registrados (400-600 nm), usando um branco de DODAB SUV na mesma concentração que foi usada na mistura DODAB/DNA em teste.

A turbidez foi plotada como uma função de $1/\lambda^2$ para verificar o caráter globular das espécies na dispersão (Carmona-Ribeiro, AM. et al., 1985; Carmona-Ribeiro, AM. & Chaimovich, H., 1986; Carmona-Ribeiro, AM. & Hix, S., 1991). Para controlar eventual agregação de glóbulos que poderiam estar contribuindo para valores de turbidez, espectros foram registrados em dois diferentes tempos: (1) imediatamente após incubação e (2) 8 horas depois. Nenhuma diferença foi obtida entre os dois espectros de turbidez.

Tabela 4.15 - Preparação de misturas de DODAB e DNAs (de bacteriófagos λ, T2, T5, T7 e T4) para detecção e estimativa de tamanho dos glóbulos formados pela aplicação da lei de Joebst

Tipo de DNA	Concentração final de DNA (em nucleotídeos) (mM)	Concentração final de DODAB na mistura (mM)	Proporção molar DODAB:DNA (em nucleotídeos) na mistura final
λ	0,154	0,50	6,8 : 1
T2	0,149	0,50	7,0 : 1
T5	0,150	0,50	6,9 : 1
T7	0,150	0,50	6,9 : 1
T4	0,151	0,50	6,9 : 1

*Concentração final fixa de DODAB na mistura foi de 0,50 mM pela adição de 250 μL de uma dispersão de DODAB (SUV) a 1,04 mM e de 250 μL de solução de DNA.

Pela Figura 4.11 obtida através do experimento citado neste item, concluímos que o complexo DODAB/DNA tem formato esférico, globular e que a dispersão é formada por partículas com tamanho aproximadamente igual ao comprimento de onda da radiação incidente: 400 a 600 nm.

De fato, tamanhos previamente relatados para complexos globulares DNA/catiônico dependem do comprimento do DNA, sendo esperados glóbulos maiores para fitas de DNA mais longas. Para os experimentos foram selecionados DNAs de bacteriófagos cujos complexos globulares poderiam ser visualizados por microeletroforese de partículas e formação de glóbulos DODAB/DNA poderiam ser detectados muito simplesmente por medidas turbidimétricas.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUIMICA
Universidade de São Paulo

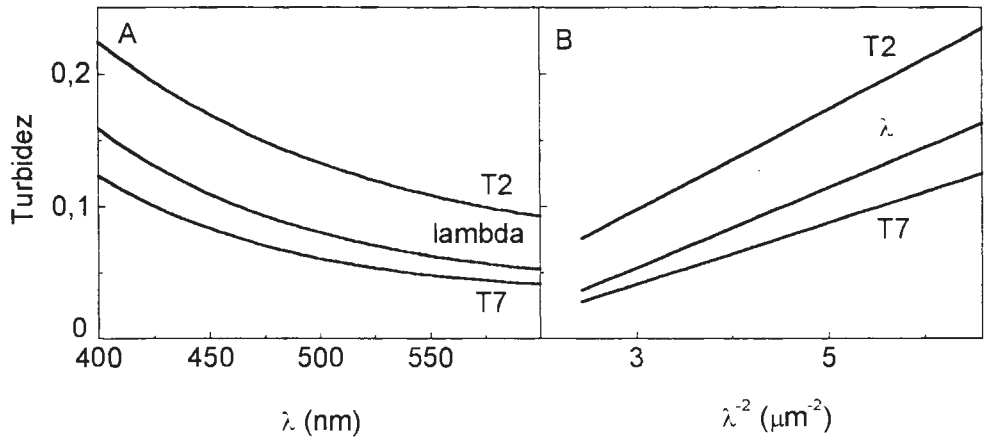


Figura 4.11 - Turbidez das misturas DNA/DODAB (vesículas pequenas de DODAB 0,5 mM e T2 DNA 0,090 mM, lambda DNA 0,095 mM ou T7 DNA 0,085 mM, ou seja, 0,15 mM em nucleotídeos para os 3 tipos de DNAs) em função do comprimento de onda (λ) da luz incidente (A) ou em função de $1/\lambda^2$ (B). Como branco, usou-se a mesma dispersão de DODAB 0,5 mM. A dependência linear é típica da lei de Joebst para espalhamento de luz para partículas esféricas, como esperado para o complexo DNA/DODAB nesta proporção molar (~DNA:DODAB 1:5) acima da neutralização de carga para o complexo.

Na Figura 4.11, observa-se que a maior cadeia de DNA que é o T2 DNA (164.000 pares de bases) resultou em maior coeficiente angular para o gráfico Turbidez x λ^{-2}. A cadeia de DNA mais curta testada correspondente ao T7 DNA (37.900 pares de bases) resultou no menor coeficiente angular dentre as 3 linhas retas traçadas e mostradas na Figura 4.11B. O DNA de tamanho intermediário, o λ DNA (48.502 pares de bases), consistentemente resultou em um coeficiente angular intermediário (Figura 4.11B). Para vesículas esféricas sintéticas de diferentes tamanhos, foi mostrado previamente uma boa correlação entre tamanho de partícula e tangente do gráfico turbidez x λ^{-2} (Carmona-Ribeiro, AM & Hix, S., 1991). Dos resultados apresentados, esta correlação parece ser válida também para glóbulos DODAB/DNA de diferentes tamanhos.

Minagawa et al.(1993, 1994) previamente obtiveram imagens de fluorescência de moléculas de T4 DNA usando um microscópio Nikon TMD equipado com uma objetiva de imersão de 100X, registrando as imagens num videotape com uma câmera Hamamatsu SIT TV de alta sensibilidade (Minagawa, K. et al., 1993, 1994). A indução da transição hélice-

glóbulo para T4 DNA foi obtida pela adição de polietilenoglicol (PEG) desde que o efeito de imiscibilidade das cadeias rígidas (DNA) e hélices flexíveis (PEG) causassem pouca solubilidade para o biopolímero DNA em PEG e mudança conformacional da hélice estendida para glóbulo mais compacto (Rau, D.C. & Parsegian, V.A, 1992).

O tamanho para glóbulo de T4 DNA foi cerca de 1 μm. Porém, assumindo 1 μm para glóbulo DODAB/T4 DNA, os tamanhos para outros 2 complexos globulares puderam ser estimados das tangentes das retas da Figura 4.11B e encontrados na Tabela 4.16. Estes tamanhos correlacionam bem o aumento dos pesos moleculares dos DNAs usados para formar os complexos DODAB/DNA.

Na Tabela 4.16, são apresentados os resultados dos cálculos da relação coeficiente angular/$[DNA]_{final}$ do gráfico de Turbidez x λ^{-2}. A partir desta relação coeficiente angular/[DNA], foi possível estimar por proporcionalidade os vários tamanhos dos glóbulos formados.

Tabela 4.16 – Cálculo da relação coeficiente angular/$[DNA]_{final}$ do gráfico de Turbidez x λ^{-2}

Tipo de DNA	Coeficiente angular (Turbidez/μm^{-2})	[DNA] (mM)	Coeficiente angular/$[DNA]_{final}$ (μm^2/M)
T2	0,0297	0,090	330,4
	0,0356	0,090	395,6
	0,0380	0,090	422,0
T7	0,0225	0,085	264,6
	0,0217	0,085	255,4
	0,0336	0,085	395,6
	0,0234	0,085	275,5
lambda	0,0364	0,095	383,5
	0,0304	0,095	320,3
	0,0243	0,095	255,7

Obs.: $[DNA]_{final}$ = concentração final de DNA na mistura

Na Tabela 4.17 é um quadro com as propriedades dos DNAs e os tamanhos estimados dos glóbulos formados na complexação com vesículas de DODAB. De fato, o tamanho do glóbulo formado é diretamente proporcional ao tamanho do DNA, isto é, tomando como referência o tamanho de 1,00 μm do glóbulo formado por T4 DNA, o glóbulo formado por T2 DNA mediu 1,00 μm e o T7, sendo o menor DNA analisado, seu glóbulo mediu 0,78 μm.

Tabela 4.17 – Estimativa do tamanho de glóbulo pela aplicação da lei de Joebst

Tipo de DNA	Peso Molecular (Da)	Pares de bases	Concentração final de DODAB sonicada na mistura (mM)	Concentração final de DNA na mistura (mM) (em nucleotídeos)	Parâmetro= coeficiente angular/$[DNA]_{final}$ *[DNA] – em nucleotídeos	Tamanho estimado do glóbulo formado (μm)
T4	110×10^6	~167.000	-	-	-	1,00
T2	110×10^6	~ 164.000	0,50	0,090	383 ± 1	1,00*
T7	25×10^6	~37.900	0,50	0,085	298 ± 66	0,78
Lambda	$31,5 \times 10^6$	48.502	0,50	0,095	320 ± 64	0,84

*Baseado no tamanho do glóbulo formado por T4 DNA e relatado por Minagawa et al. em 1994.

4.8 - Quantificação da adsorção de vesículas de DODAB ao DNA de bacteriófagos (λ, T2, T4, T5 e T7)

Na Tabela 4.18, são apresentados os resultados obtidos da interação entre DODAB SUV e vários tipos de DNAs (λ, T2, T4, T5 e T7), conforme métodos do item 3.2.17 de Materiais e Métodos. Foram tabuladas as proporções molares entre $DODAB_{adsorvido}$/DNAs. Em excesso de DODAB, foram obtidas as adsorções limites de DODAB sobre DNA, que na média foi de cerca de 70 moléculas de DODAB por nucleotídeo de DNA e a proporção molar não dependeu do tipo de DNA. A proporção molar de 70:1 de DODAB:DNA indica o caráter positivo do complexo que também pode ser observado nos experimentos com concentrações finais de DODAB acima da neutralização de carga.

Pelos resultados deste experimento, foi observado que todo DODAB se complexou com moléculas de T4 DNA enquanto com λ DNA, parte do DODAB apareceu como um excesso. Pela dificuldade em se conseguir T4 DNA, foram realizadas novas determinações com T2, T5 e T7 DNA. T2 DNA tem tamanho muito próximo ao do T4 DNA.

Concentrações de DNA (em nucleotídeo) maiores que 20 μM não puderam ser esgotadas com 1,00 mM de DODAB SUV, porém, até 15 μM, foi possível determinar o excedente em vesículas. Isto pôde ser aplicado a todos os tipos de DNAs testados.

Tabela 4.18 - Quantificação da adsorção de DODAB SUV sobre DNAs de bacteriófagos nas misturas DNA/DODAB

Tipo de DNA	[DODAB] na mistura (mM)	[DNA] na mistura (em nucleotídeo) (mM)	[DODAB] no filtrado (mM)	[DODAB] adsorvido (mM)	Proporção molar (PM) $DODAB_{adsorvido}$:DNA	PM média
T4	0,96	0,040	0	0,96	24*	
		0,020	0	0,96	48*	
λ	1,01	0,015	0,12	0,89	61	88±38
		0,007	0,16	0,85	115	
T2	0,96	0,007	0,18	0,78	112	62±33
		0,014	0,31	0,65	46	
	0,87	0,007	0,52	0,35	49	
		0,014	0,28	0,59	42	
T5	0,96	0,007	0,35	0,61	90	71±16
		0,014	0,12	0,83	61	
	0,87	0,007	0,19	0,68	100	
		0,014	0,03	0,84	62	
T7	0,96	0,007	0,43	0,53	78	71±16
		0,014	0,06	0,90	66	
	0,87	0,007	0,26	0,60	88	
		0,014	0,17	0,69	51	

*Notar que não ocorreu a condição de adsorção máxima para o T4 DNA nas condições testadas.

4.9 - Deslocamento de Merocianina 540 ou DAPI pela interação DNA/membrana catiônica

A primeira etapa da interação DODAB/DNA realmente envolve atração eletrostática entre a vesícula de DODAB e DNA, possivelmente com formação de pares iônicos como evidenciado pelo deslocamento de marcadores localizados ou na superfície do DNA ou na superfície da bicamada de DODAB. A Figura 4.12 dá indicações que a interação leva ao deslocamento de merocianina (MC) do seu sítio sobre a superfície de bicamada de DODAB para a água (Carmona-Ribeiro, AM., 1993). O nucleotídeo DMP gera uma mudança espectral similar para MC nas misturas DODAB/DMP (Figura 4.12C, D). Os espectros de MC resultantes são uma composição do espectro em água pura (correspondendo ao deslocamento de MC de seu sítio na bicamada de DODAB) e espectro na bicamada de

DODAB (correspondendo às moléculas de MC que permaneceram na superfície da bicamada de DODAB).

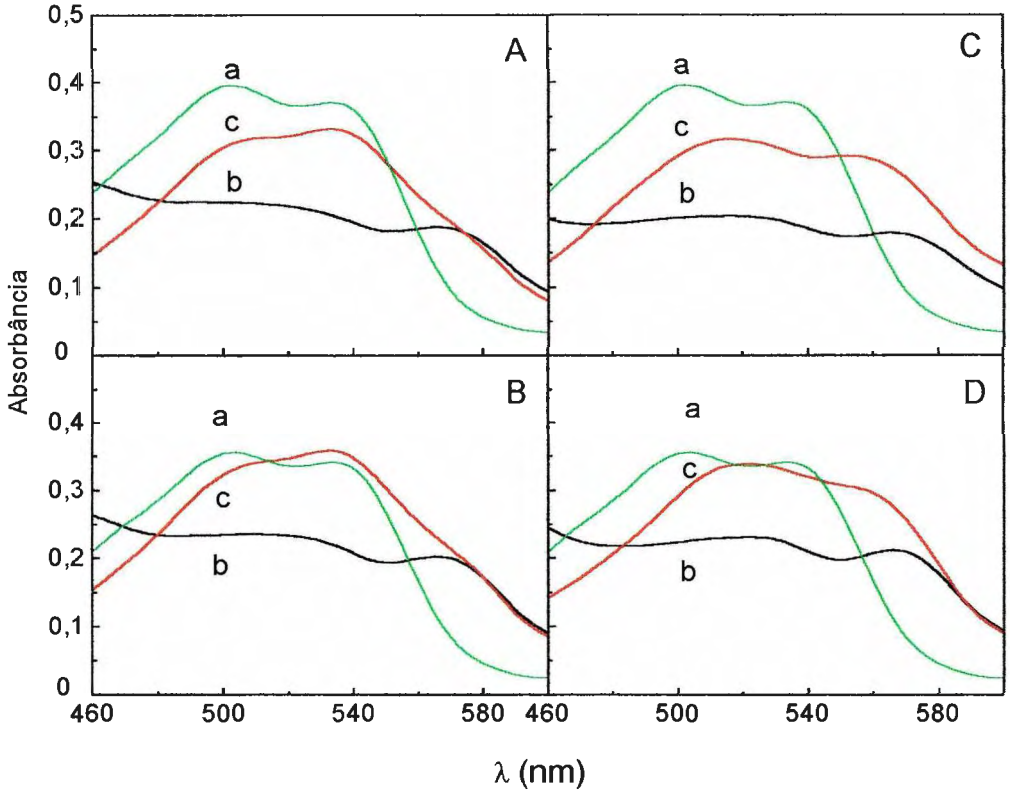


Figura 4.12 - Espectros ópticos de merocianina 540 em (a) água pura; (b) em vesículas de DODAB; (c em A e B) em misturas λ DNA/DODAB; (c em C e D) misturas DMP/DODAB. Os espectros típicos para merocianina (0,010 mM) em água possuem um formato diferente na presença de ácido nucleico (em nucleotídeos - 0,15 mM de λ DNA) ou DMP (2,0 mM) que se assemelham aos espectros de merocianina em água, ilustrando o deslocamento do marcador de seu sítio na bicamada de DODAB. Vesículas obtidas por aquecimento (em A e C) ou por vaporização clorofórmica (em B e D). [DODAB]=0,08 mM em A e B e [DODAB] =1,0 mM em C e D.

Nas Figuras 4.12A e 4.12B (espectro *c*), observa-se que a presença de DNA na mistura DODAB + MC fez parte da sonda merocianina ser deslocada da membrana da vesícula para a solução, dando lugar ao DNA para interagir com DODAB, fazendo com que

o pico de 565 nm (espectro *b*), que indica a inserção da MC na membrana desaparecesse, tornando as curvas mais próximas da curva característica de MC em água (espectro *a*), com picos em 500 e 530 nm. Somente as curvas com DODAB + MC apresentaram os picos em 565 nm (espectros *b*). A Figura 4.12 indica que vesículas obtidas por injeção clorofórmica (Figuras 4.12B, 4.12D) ou por aquecimento (Figuras 4.12A, 4.12C) apresentaram comportamentos análogos com os espectros de MC, bem como uma analogia entre o comportamento de nucleotídeo e DNA, ambos expulsam parte da merocianina dos defeitos hidrofóbicos da membrana.

Resultados análogos aos obtidos pelo cromóforo MC foram obtidos (Figura 4.13) com DAPI, um marcador fluorescente localizado tipicamente no sulco menor do DNA. Os espectros de fluorescência de DAPI na mistura DODAB/DNA (Figura 4.13F) foram similares aos espectros de DAPI em água pura (vide comparação de espectros na Figura 4.13B, F), indicando que parte do DAPI foi deslocado de seu sítio usual no DNA devido à interação DODAB/DNA.

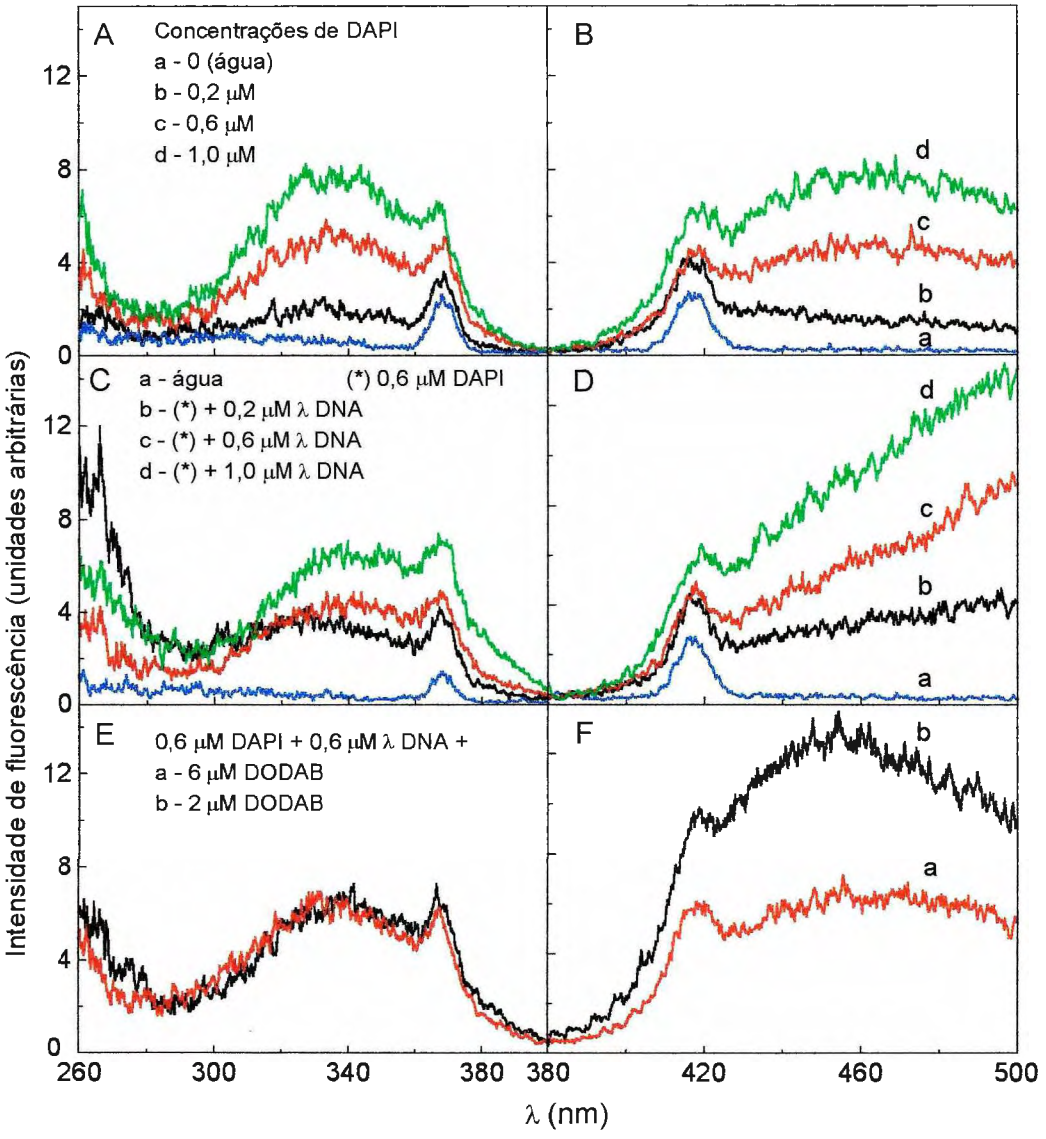


Figura 4.13 - Espectros de excitação e emissão de fluorescência de DAPI em água pura (A, B), incorporada em λ DNA (C, D), em misturas λ DNA/DODAB vesículas grandes. [DAPI]final = 0,6 μM (C, D, E, F) em 3 diferentes concentrações de DNA (b, c, d), sem DODAB em C e D e em 2 concentrações de DODAB diferentes para misturas DODAB/DNA (E, F). Espectros de DAPI nas misturas DODAB/DNA tornam-se similares aos obtidos por DAPI em água pura, mostrando seu deslocamento de seu sítio anterior do DNA. Obs.: Concentração de DNA expresso em concentração de nucleotídeos.

Nas Figuras 4.13A e 4.13B, ocorreu a esperada proporcionalidade entre concentração do marcador e sua intensidade de fluorescência emitida em 465 nm. Observa-se que com aumento de concentração de DAPI na solução aquosa, aumentou também a intensidade de fluorescência emitida.

Nas Figuras 4.13C e 4.13D, foi possível observar o efeito do DNA λ sobre o espectro de fluorescência de DAPI. Para uma concentração final de DAPI (0,6 μM), conforme foi se aumentando a concentração de DNA λ adicionada, a intensidade de fluorescência emitida também sofria aumento, conforme maior número de moléculas de DAPI foram se adsorvendo aos sulcos menores de DNA.

Na situação de concentração final de DAPI de 0,6 μM e de DNA do fago λ também em 0,6 μM, observou-se nas Figuras 4.13E e 4.13F, que quanto mais DODAB foi adicionado, maior foi a semelhança dos espectros com os espectros do DAPI em água e menor a intensidade de fluorescência emitida, sugerindo o deslocamento de DAPI do sítio de ligação ao DNA para a água, um resultado semelhante ao obtido para o efeito do DODAB sobre espectros de absorbância de luz da MC, esta sendo deslocada da membrana da vesícula para a água devido à interação DMP ou DNA e DODAB.

4.10 - Ruptura de vesículas de DODAB induzida pelo DNA

Na Figura 4.14A são observadas as curvas de controle da permeação de sacarose através da membrana de diálise. A curva descendente corresponde à diminuição de radioatividade no lado A da hemicâmara de diálise em função do tempo devido à migração de sacarose radioativa através da membrana de celulose para o lado B da hemicâmara. Em correspondência à essa diminuição de radioatividade no lado A, teve-se um aumento de radioatividade no lado B, conforme curva ascendente da mesma figura.

Na Figura 4.14B, são observadas as curvas de controle da capacidade de dispersão de DODAB de incorporar e reter sacarose em seu compartimento aquoso interno. As curvas descendente e ascendente corresponderam como na Figura 4.14A à migração de [^{14}C]sacarose do lado A da hemicâmara para o lado B.

Nas Figuras 4.14C e 4.14D, observam-se os resultados obtidos com DODAB interagindo com λ DNA ou com T4 DNA, respectivamente.

Observou-se que a vesícula sozinha em água (Figura 4.14B) já sofreu alguma ruptura, liberando [^{14}C]sacarose ao meio. Porém, o fenômeno foi mais acentuado na presença de DNA dos fagos λ e T4, indicando que a interação vesícula-DNA deve ter ocasionado maior liberação de [^{14}C]sacarose, assim como o fenômeno observado quando da interação com DMP. Interações estas mais profundas que levaram a mudanças conformacionais tanto das vesículas como das moléculas de DNA, levando à formação de complexos.

Na Tabela 4.19 são apresentadas as porcentagens médias de ruptura de vesículas de DODAB. Estas vesículas por si só apresentaram cerca de 24% de ruptura no equilíbrio e as interações com DNAs, aumentaram significativamente estas porcentagens, isto é, cerca de 46% e 68% para λ e T4 DNA, respectivamente nas condições citadas.

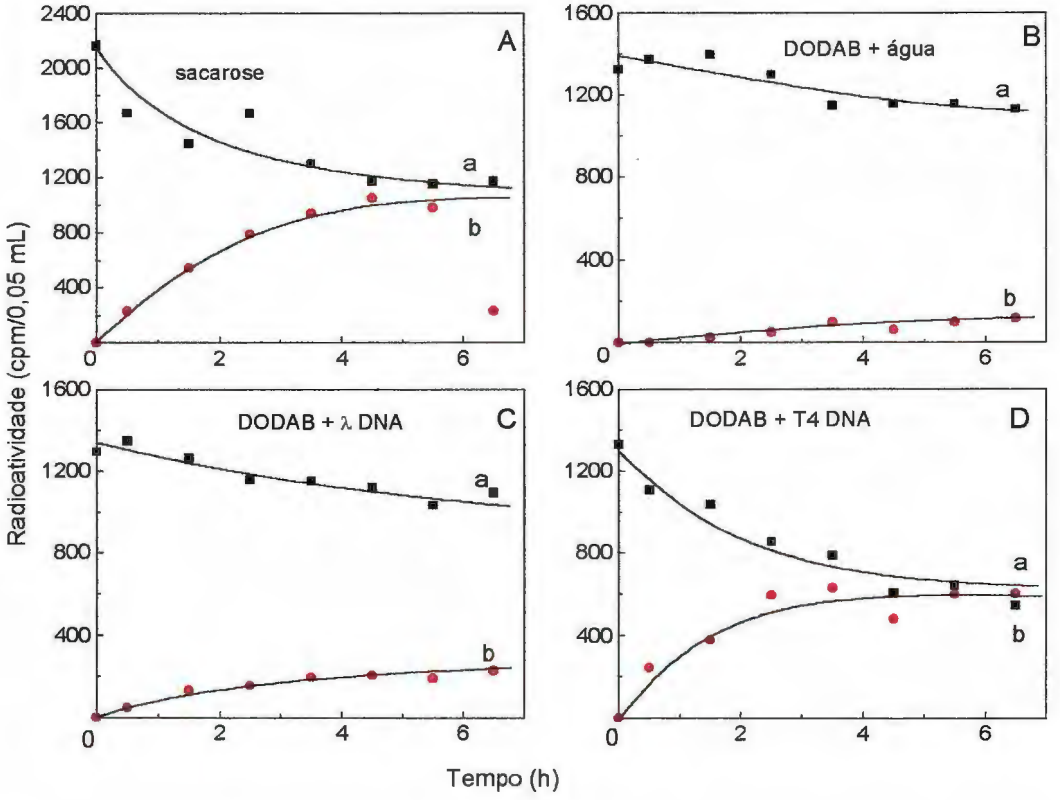


Figura 4.14 - Detecção da ruptura de vesículas de DODAB (LUV) por diálise de equilíbrio. A - diálise controle com solução de sacarose radioativa em a; B - diálise controle com dispersão de DODAB 1,0 mM em a; C - diálise com mistura DODAB 1,0 mM/λ DNA 30,8 μM (em nucleotídeo) em a; D - diálise com mistura DODAB 1,0 mM/T4 DNA 91,2 μM (em nucleotídeo) em a. No instante zero, o lado b da câmara de equilíbrio continha apenas água pura.

Tabela 4.19 - Efeito do DNA sobre a ruptura de vesículas de DODAB (LUV) obtidas por aquecimento

Mistura	%Ruptura média no equilíbrio (Re)
DODAB + água	24,4 ± 9,1
DODAB + λ	46,1 ± 11,0
DODAB + T4	68,0

*concentrações finais na mistura: DODAB - 1 mM; T4 DNA - 91,2 μM (em nucleotídeo); λ DNA - 30,8 μM (em nucleotídeo)

4.11 - Separação de fitas no DNA duplex

Nas condições de excesso de DODAB, isto é, na adsorção limite de DODAB sobre DNA, o complexo DODAB/DNA apresentou uma proporção molar de cerca de 70 moléculas de DODAB adsorvidos por nucleotídeo de DNA (Tabela 4.18). Isto indica o caráter de carga positiva do complexo assim formado como também o obtido em concentrações finais de DODAB acima da neutralização de carga como na Figura 4.10. Além disso, esta proporção não foi afetada pelo tipo de DNA. Porém, mudanças conformacionais do DNA no complexo devem ter ocorrido como observado pelo experimento da incidência de luz e pela sua dispersão que segue a lei de Joebst (item 4.7 de Resultados e Discussão).

Do ponto de vista de vesícula catiônica, um simples nucleotídeo, como o DMP, foi capaz de causar ruptura de vesículas grandes de DODAB (Kikuchi, I.S. et al., 1999) (Figura 4.14; Tabela 4.19). A Tabela 4.19 mostrou que DNA também foi capaz de causar ruptura de DODAB LUV. De fato, a interação DODAB/DNA foi mais íntima que aquela determinada pela atração eletrostática dirigida por cargas opostas em ambas as moléuclas.

A interação hidrofóbica entre bases nitrogenadas de DNA e cadeias hidrocarbônicas da bicamada de DODAB pôde causar separação das fitas que constituem a dupla fita de DNA do bacteriófago. Isto foi demonstrado pelos experimentos com registro de absorbância de DNA a 260 nm como uma função de temperatura (Figura 4.15).

Na Figura 4.15B, observa-se uma curva típica de absorbância em função da temperatura para moléculas de DNA e a mesma curva alterada quando da presença de vesículas de DODAB (SUV), com seu deslocamento para cima, apesar da curva ser

semelhante à curva típica de DNA. Os pontos de inflexão de ambas as curvas indicaram a temperatura de fusão das cadeias de DNA, que permanece o mesmo (~69 °C). Na Figura 4.15B, observam-se os mesmos efeitos, porém, a escala de absorbância foi substituída pela de absorbância relativa ($A_T/A_{35\,°C}$), sendo:

A_T = Absorbância à citada temperatura;

$A_{35\,°C}$ =Absorbância à temperatura de 35 °C

Na Figura 4.15B, a curva típica de DNA aparece acima da curva para a mistura DNA/DODAB, porém, os pontos de inflexão apontaram para a mesma temperatura de fusão observada na Figura 4.15A .

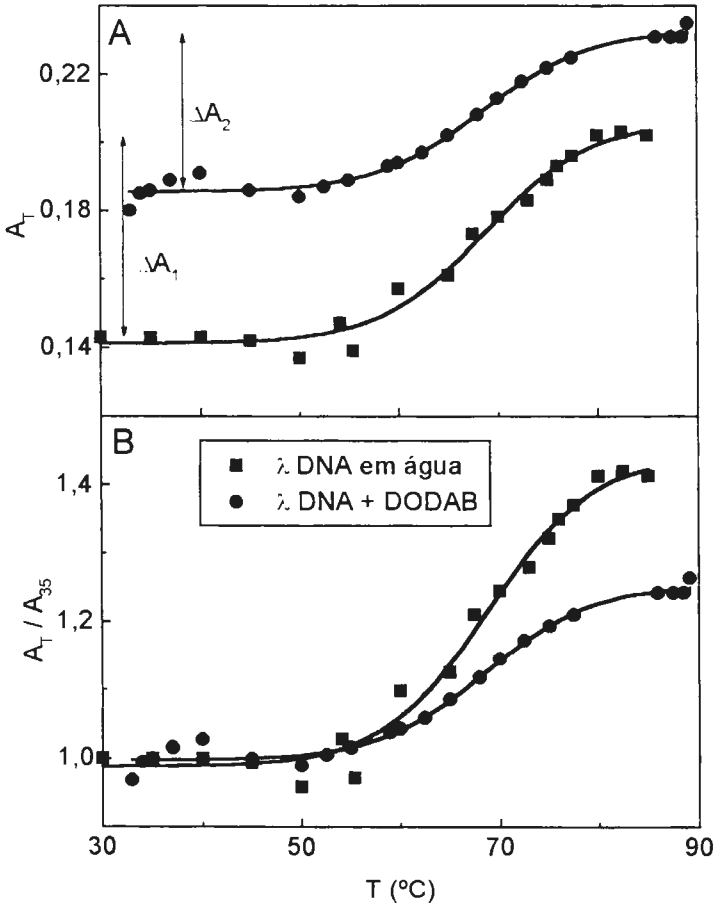


Figura 4.15 - Efeito de vesículas pequenas de DODAB sobre a curva de fusão do λ DNA. Em A, a absorbância a 260 nm (A_T) foi plotada em função da temperatura (T) para DNA (■) ou para uma mistura DNA/DODAB (DNA 0,014 mM e DODAB 1,0 mM) (●). Em B, absorbâncias normalizadas para Absorbância a 35 °C em função de temperatura.

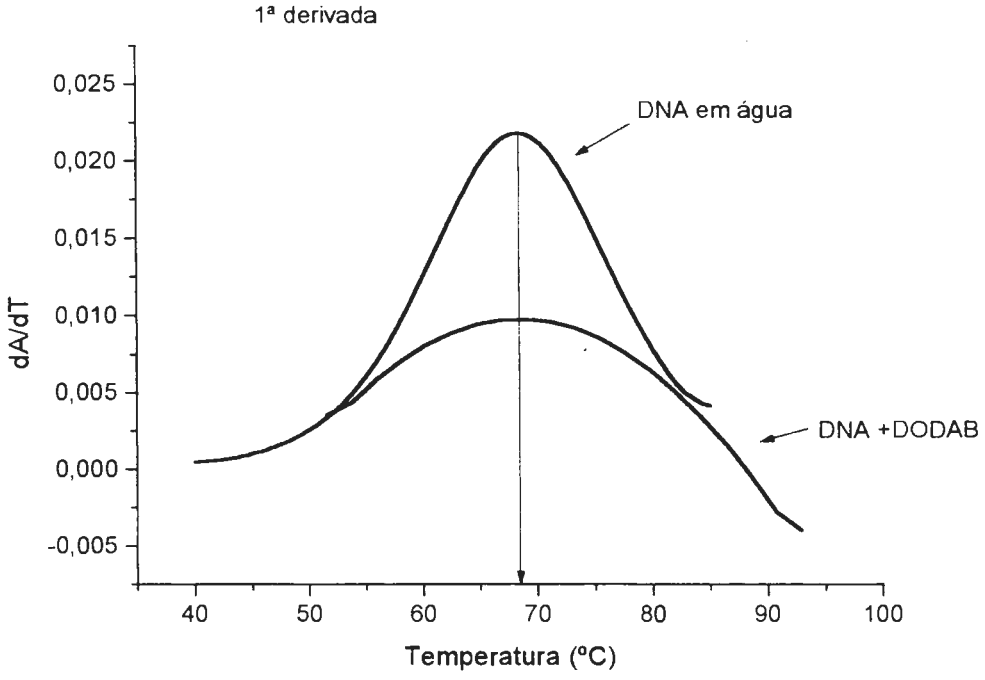


Figura 4.16 - Efeito do DODAB sobre curva de fusão de DNA dupla fita. Curvas resultantes da derivada 1ª das curvas de fusão de DNA e de (DNA + DODAB) da Figura 4.15B, isto é, da curva de Absorbância relativa ($A_T/A_{35\,°C}$) x Temperatura.Os picos das curvas (Fig. 4.16) correspondem aos pontos de inflexão das curvas de fusão de DNA da Figura 4.15B. A seta aponta para a temperatura de fusão (T_m) de DNA dupla fita que é cerca de 69 °C.

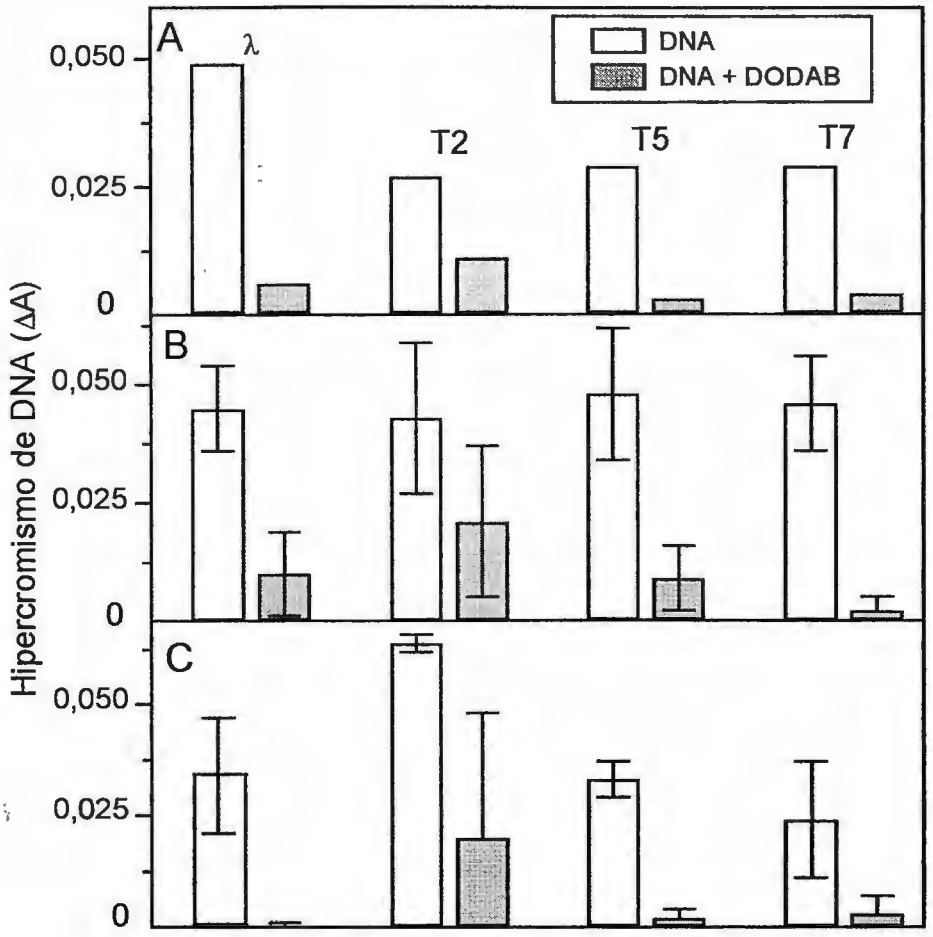


Figura 4.17 - Efeito de vesículas pequenas de DODAB sobre o hipercromismo de DNA (ΔA) para 4 diferentes tipos de DNA. Há uma redução do efeito hipercrômico esperado pela separação das fitas da dupla hélice devido à interação hidrofóbica entre as bicamadas de vesículas pequenas de DODAB e a porção hidrofóbica das bases nitrogenadas de DNA. Em A e B, as concentrações finais de DNA (em nucleotídeos) e DODAB são : 0,014 e 1,0 mM, respectivamente. Em C, as concentrações finais de DNA e DODAB são 0,028 e 2,0 mM, respectivamente.

Na Figura 4.17, esta redução de hipercromismo de DNA na presença de DODAB SUV e típica de separação de dupla fita foi generalizada para vários DNAs de bacteriófagos. O hipercromismo foi basicamente reduzido a zero para todas as duplas fitas de DNA testados, sendo uma forte indicação que o DODAB foi capaz de realizar uma tarefa previamente realizada pelo aumento de temperatura, isto é, a separação da dupla fita de DNA. A explicação para este efeito é simples: cadeias hidrocarbônicas de DODAB interagem com as bases nitrogenadas do DNA dupla fita, bicamadas de vesículas estão sendo rompidas e duplas fitas estão sendo separadas.

A Figura 4.16 apresenta as derivadas primeiras das curvas da Figura 4.15B em função da temperatura. Os picos máximos apontam para um mesmo valor de temperatura de fusão (T_m) observadas nas Figuras 4.15A e 4.15B (~69 °C). Pelo gráfico de temperatura x Absorbância, foi possível observar que a temperatura de fusão do DNA correspondente aos pontos de inflexão das curvas ocorre em 69,2 °C. O DODAB não afetou essa temperatura de fusão mas diminuiu o efeito de hipercromismo do DNA que mostrou-se praticamente fundida no início da curva de fusão. Isso sugere que a interação DODAB/DNA possa ter denaturado parcialmente a dupla fita, o que seria de se esperar caso a interação hidrofóbica entre a bicamada e as bases nitrogenadas do DNA tivessem o poder de denaturar a dupla fita, conforme sugerido também pela ruptura vesicular.

Na Tabela 4.20, observa-se que em presença de DODAB houve uma diminuição do hipercromismo dos DNAs (valores de ΔA na faixa de 0,015 a 0,020) enquanto DNAs em água apresentaram valores de ΔA maiores, na faixa de 0,040, isto é, o efeito hipercrômico diminuiu cerca de 50% em presença de DODAB.

Tabela 4.20 – Leituras turbidimétricas para determinação da diminuição do efeito hipercrômico provocado por vesículas de DODAB (SUV) na proporção molar DODAB:DNA de 70 : 1.

Misturas	Amostras	Absorbância A1 (35 °C)	Absorbância A2 (85 °C)	ΔA = A2-A1
λ/água	14 μM λ DNA em água	0,110 ± 0,020	0,154 ± 0,005	0,044
	28 μM λ DNA em água	0,220 ± 0,011	0,254 ± 0,002	0,024
T2/água	14 μM T2 DNA em água	0,110 ± 0,014	0,158 ± 0,018	0,048
	28 μM T2 DNA em água	0,214 ± 0,002	0,279 ± 0,005	0,065
T5/água	14 μM T5 DNA em água	0,088 ± 0,007	0,136 ± 0,009	0,048
	28 μM T5 DNA em água	0,185 ± 0,004	0,218 ± 0,008	0,033
T7/água	14 μM T7 DNA em água	0,118 ± 0,010	0,161 ± 0,006	0,043
	28 μM T7 DNA em água	0,236 ± 0,001	0,259 ± 0,013	0,023
λ/DODAB	14 μM λ DNA + 1.0 mM DODAB	0,188 ± 0,012	0,209 ± 0,033	0,021
	28 μM λ DNA + 2.0 mM DODAB	0,382 ± 0,000	0,370 ± 0,001	-0,012
T2/DODAB	14 μM T2 DNA + 1.0 mM DODAB	0,208 ± 0,029	0,229 ± 0,043	0,021
	28 μM T2 DNA + 2.0 mM DODAB	0,428 ± 0,037	0,437 ± 0,008	0,009
T5/DODAB	14 μM T5 DNA + 1.0 mM DODAB	0,142 ± 0,006	0,152 ± 0,011	0,010
	28 μM T5 DNA + 2.0 mM DODAB	0,288 ± 0,009	0,286 ± 0,016	-0,002
T7/DODAB	14 μM T7 DNA + 1.0 mM DODAB	0,180 ± 0,008	0,199 ± 0,030	0,019
	28 μM T7 DNA + 2.0 mM DODAB	0,345 ± 0,010	0,347 ± 0,016	0,002

*Leituras em comprimento de onda de 260 nm.

Na Tabela 4.20, a proporção molar DODAB:DNA de 70:1 sempre foi mantida, apesar de, em cada caso, termos dobrado as concentrações de DODAB e DNA, visando melhorar as leituras de absorbância com aumento de concentração dos DNAs. Realmente, ao serem dobradas as leituras A1 e A2, foi possível observar melhor a diminuição do efeito hipercrômico dos DNAs que praticamente desapareceu em presença de DODAB.

Na Tabela 4.21, são apresentados os dados utilizados para a construção do gráfico da Figura 4.16, resumindo os efeitos observados na Tabela 4.20.

Tabela 4.21 - Resultados sumarizados de vários experimentos para determinação do efeito do DODAB na diminuição do hipercromismo dos DNAs.

	$[DNA]_1$	$[DNA]_2$
Misturas	$\Delta A \pm \delta$	$\Delta A \pm \delta$
Lambda DNA em água	0,045 ± 0,009	0,034 ± 0,013
T2 DNA em água	0,043 ± 0,016	0,064 ± 0,002
T5 DNA em água	0,048 ± 0,014	0,033 ± 0,004
T7 DNA em água	0,046 ± 0,010	0,024 ± 0,013
Lambda/DODAB	0,010 ± 0,009	0,000 ± 0,001
T2/DODAB	0,021 ± 0,016	0,020 ± 0,028
T5/DODAB	0,009 ± 0,007	0,002 ± 0,002
T7/DODAB	0,002 ± 0,003	0,003 ± 0,004

Obs.: $[DNA]_1$ = experimentos com concentração de DNA de 14 μM; $[DNA]_2$ = experimentos com concentração de DNA de 28 μM

Embora a maioria dos resultados estejam consistentes com a informação publicada (Pansu, R.B. et al., 1990; Carmona-Ribeiro, AM. et al., 1991), as proporções muito altas de DODAB:DNA, em nucleotídeos, cerca de 70:1, não são normalmente obtidas para complexos e podem estar relacionadas com um comportamento particular para dispersões de DODAB sonicadas, onde fragmentos de bicamada estão presentes. O efeito hidrofóbico então ajudaria a agregar fragmentos de bicamadas sobre o complexo.

Finalmente, o complexo formado entre T4 DNA e DODAB foi recentemente avaliado sob análise de difração de raios X (Mel'nikov, S.M. et al., 1997). Foi relatado que o complexo DNA-DODAB forma uma estrutura multilamelar altamente ordenada com um espaçamento lamelar de cerca de 4,84 nm (Mel'nikov, S.M. et al., 1997). Estes resultados estão de acordo com a principal afirmação para a importância da interação hidrofóbica: a espessura da fita simples de DNA (0,9-1,3 nm) mais a espessura de uma monocamada de DODAB interagindo hidrofobicamente (2,5 nm) mais a camada de água fortemente ligada entre a porção fosfato e cabeças polares de DODAB (1,0 nm) realmente dariam 4,4-4,8 nm para a distância de repetição (Kikuchi, I.S. & Carmona-Ribeiro, AM., 2000). Vide Figura 4.18.

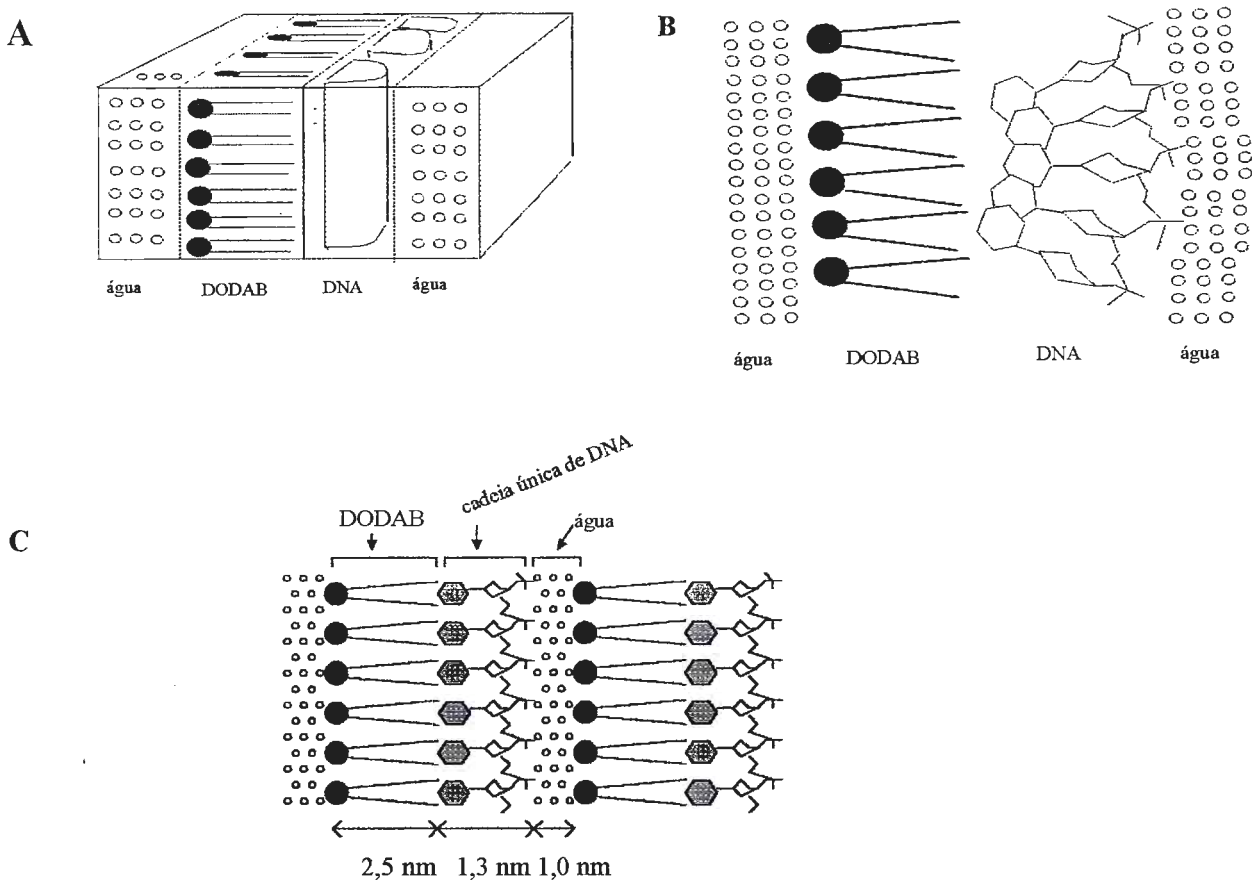


Figura 4.18 - Um modelo para o complexo T4 DNA/DODAB que está de acordo com a distância de repetição de 4,84 nm (Mel'nikov, S.M. et al., 1997) e com a interação hidrofóbica entre bases nitrogenadas e cadeias hidrocarbônicas do lipídio catiônico (Kikuchi, I.S. et al., 1999; Kikuchi, I.S. & Carmona-Ribeiro, AM., 2000). A) Perfil tridimensional; B) Vista superior transversal; C) Vista longitudinal..

4.12 – Transformação de *Escherichia coli* DH 5α usando DODAB

A seguir são apresentados os resultados de contagens de bactérias viáveis após interação com plasmídeo, pelo método clássico de cloreto de cálcio, bem como com complexos formados por vesículas de DODAB obtidas por sonicação ou por aquecimento, isto é, vesículas pequenas e grandes, respectivamente.

O tubo de interação entre bactérias e plasmídeo, contendo cloreto de cálcio (tubo A1), apresentou 1,5 x 10^5 UFC/mL de transformados quando plaqueado no meio sólido de MH(Mueller-Hinton) + ampicilina contra 4 x 10^8 UFC/mL dos microrganismos totais presentes no meio MH (transformantes e não transformantes), isto é, eficiência de transformação de 0,1% como previsto pelo método.

O Tubo em que ocorreu interação de bactérias com complexo DODAB/plasmídeo (tubo A2), apresentou 300 UFC/mL de resistentes à ampicilina contra 6 x 10^7 UFC/mL de população total, isto é, eficiência de transformação de $1/10^5$.

Tabela 4.22a – Contagens de microrganismos viáveis do inóculo utilizado nas interações com $CaCl_2$ ou DODAB

Diluição	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^0	-	< 100
10^{-5}	5,5 x 10^8	-
10^{-6}	3,7 x 10^8	-
Resultado final:	4,61 x 10^8	< 100

Tabela 4.22b - Contagens de microrganismos viáveis no Tubo A1 (com cloreto de cálcio)

Diluição	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^{-2}	-	$1,5 \times 10^5$
10^{-3}	$> 10^5$	$1,3 \times 10^5$
10^{-4}	$> 10^5$	$1,0 \times 10^5$
10^{-6}	4×10^8	-
Resultado final:	4×10^8	$1,5 \times 10^5$

Tabela 4.22c – Contagens de microrganismos viáveis no Tubo A2 (com DODAB):

Diluição	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
	Em meio MH	Em meio MH + ampicilina
10^0	-	290
10^{-1}	-	300
10^{-3}	$> 10^5$	-
10^{-4}	$> 10^5$	-
10^{-6}	6×10^7	-
Resultado final:	6×10^7	300

<u>Eficiência (E) de transformação de *E. coli* 5α:</u>

<u>- Com cloreto de cálcio (tubo 1):</u>

E = células transformadas/número total de células

$E = (1,5 \times 10^5)/(4 \times 10^8) \cong 1/10^3$ ou 0,1%

<u>- Com DODAB (tubo 2) :</u>

$E = 300/(6 \times 10^{7)} = 0,5 \times 10^5$ ou $10^2/10^7 = 1/10^5$

Destes resultados, pode ser observado que DODAB SUV não matou a *E. coli*, pois houve crescimento de colônias no meio sem ampicilina em que foram detectadas tanto as células transformadas como as não transformadas e o método clássico com $CaCl_2$ serviu como comparação, mostrando um índice de eficiência esperado para a técnica, isto é, em torno de 0,1%. Porém, com DODAB, a eficiência de transformação foi menor, isto é, 100

vezes mais baixa. Devido a este fato, foi realizado outro experimento, porém, utilizando vesículas grandes obtidas por aquecimento.

Na Tabela 4.23a, observou-se que não houve bactérias transformadas no início do 2º experimento e que o número de viáveis permaneceu estável durante todo o experimento, cerca de 8,0 x 10^9 UFC/mL.

Na Tabela 4.23b, foi obtido índice de transformação de cerca de 0,01% pelo método utilizando cloreto de cálcio. Na Tabela 4.23c, os resultados se referiram à complexação do DNA com vesículas pequenas de DODAB e a cada 10^7 bactérias foi obtida uma bactéria transformada e na Tabela 4.23d, na complexação do DNA com vesículas grandes, nenhum transformante foi obtido.

Tabela 4.23a – Contagem de microrganismos viáveis do inóculo utilizado nas interações com $CaCl_2$, vesículas grandes ou vesículas pequenas de DODAB

	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
Diluição	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^0	-	< 100
10^{-6}	8,9 x 10^9	-
Resultados finais:	8,9 x 10^9	< 100

Tabela 4.23b – Contagem de microrganismos viáveis no Tubo B1 (método com $CaCl_2$)

	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
Diluição	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^{-1}	> 10^5	1,0 x 10^5
10^{-2}	> 10^5	1,0 x 10^5
10^{-5}	4,8 x 10^9	-
Resultados finais:	4,8 x 10^9	1,0 x 10^5

Eficiência de transformação = transformada/total = 1,0 x 10^5/4,8 10^9 = ~1/10^4

Tabela 4.23c – Contagem de microrganismos viáveis no Tubo B2 (vesículas pequenas)

Diluição	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^0	-	700
10^{-1}	$> 10^5$	400
10^{-2}	$> 10^5$	-
10^{-5}	$1,5 \times 10^9$	-
Resultados finais:	$1,5 \times 10^9$	400

Eficiência de transformação = transformada/total = $400/1,5 \times 10^9 = \sim 1/10^7$

Tabela 4.23d – Contagem de microrganismos viáveis no Tubo B3 (vesículas grandes)

Diluição	Contagem de viáveis (UFC/mL) em:	
	Meio MH	Meio MH + ampicilina
10^0	-	< 100
10^{-1}	$> 10^5$	< 100
10^{-2}	$> 10^5$	-
10^{-5}	$7,9 \times 10^8$	-
Resultados finais:	$7,9 \times 10^8$	< 100

Com vesículas grandes, não foram detectadas colônias de bactérias transformadas. O tipo de vesícula deve ter influenciado no tamanho das partículas formadas, inviabilizando a entrega de DNA às células. Devem ser realizados novos experimentos para averiguar essa hipótese.

Apesar de não ser a mais adequada, foi utilizada a técnica com $CaCl_2$ por ser um método clássico e também por ser mais barato do que usar lipossomos comerciais. Invés de detectar β-galactosidase, optou-se por detectar a resistência à ampicilina conferida pelo gene presente no vetor, o que foi uma indicação da transformação das bactérias e uma possibilidade de transfecção em células eucarióticas.

Estes experimentos com *E. coli* estão de acordo com resultados de Ross & Hui (1999) que observaram o importante papel do tamanho dos complexos formados por DNA e lipossomos catiônicos (os lipoplexes) para eficácia de transfecção.

Apesar de uma transformação bacteriana ser muito diferente de uma transfecção em células eucarióticas, esta pode ser utilizada para estudos de, por exemplo, influência do tamanho das partículas ou mecanismo de entrega através de uso de marcadores fluorescentes no DNA e/ou lipídios. Trabalhar com bactérias é mais fácil, rápido e barato para detectar as transformantes.

5 - CONCLUSÕES

1) Isotermas de adsorção de DMP sobre vesículas grandes de DODAB mostram ocorrência de adsorção máxima para a proporção molar 2:1 DODAB:DMP. A linearização das isotermas de adsorção pelo modelo de Langmuir também permite obter proporção molar de 2:1 (DODAB : DMP) na adsorção limite. A presença de íons diminui a ligação do nucleotídeo ao lipossomo enquanto moléculas não-iônicas como a D-Glicose não interferem na relação molar DODAB/DMP.

2) Em condições de adsorção limite, a adição de DMP às vesículas de DODAB em D-Glicose não induz floculação pois o complexo DODAB/DMP tem carga positiva.

3) A presença de NaBr 5 mM em solução impede a formação do complexo DODAB/DMP.

4) Vesículas de DODAB sofrem agregação em altas concentrações de sais e na presença de D-Glicose. Vesículas com nucleotídeo adsorvido em condições de adsorção limite (2 DODAB : 1 DMP) preparadas e mantidas em soluções aquosas se mantêm estáveis por longo período (observação de 1 semana). Excesso de DMP em relação ao DODAB ([DMP] > [DODAB]) induz floculação rápida das vesículas.

5) A mobilidade eletroforética do complexo DMP/DODAB é mínima quando a adsorção de DMP à vesícula de DODAB é máxima. Ambas ocorrem para a proporção molar de 2:1 (DODAB:DMP).

6) Há aumento de vazamento de sacarose radioativa a partir do compartimento intravesicular para o meio externo em presença de nucleotídeo DMP, sugerindo inserção do nucleotídeo na membrana.

7) DMP comporta-se como um ânion hidrofóbico e induz floculação dos lipossomos catiônicos na faixa de concentração de milimolar, em contraste com ânions simples e não hidrofóbicos como o Cl^- que induzem floculação na faixa de centenas de milimolar.

8) A proporção molar DODAB adsorvido:DNA (em nucleotídeos) na condição de adsorção máxima foi de 70:1 para todos os DNAs testados.

9) O complexo DODAB-DNA (T4 e λ) em excesso de DODAB possui carga positiva. O complexo DNA/DODAB é globular e pode ser visualizado através de microscopia óptica de campo escuro.

10) Há deslocamento de cromóforos ou marcadores fluorescentes pela interação DNA/membrana catiônica ou DMP/membrana catiônica.

11) Há ruptura vesicular em decorrência da interação DNA/vesícula catiônica.

12) Quanto maior o comprimento da fita de DNA, maior é o tamanho do glóbulo formado quando da interação com DODAB, de acordo com os tamanhos de glóbulo estimados pela lei de Joebst para espalhamento de luz por partículas.

13) O DODAB tem o efeito de separar as duplas fitas à temperatura ambiente, fazendo desaparecer o efeito hipercrômico.

Em suma, quando vesículas catiônicas de DODAB interagem com nucleotídeo DMP ou DNAs, a aproximação destas moléculas deve estar sendo dirigida por atração eletrostática entre cabeça catiônica do anfifílico e grupos fosfato de DMP ou DNAs, mas as forças que mantêm o complexo formado devem ser as interações hidrofóbicas entre cauda hidrocarbônica do anfifílico e bases nitrogenadas dos nucleotídeos. A Figura 4.18 (Resultados e Discussão) propôs um modelo de estrutura para o complexo DNA/anfifílico catiônico que estaria de acordo com os resultados experimentais apresentados nesta tese.

6 - PERSPECTIVAS

As principais perspectivas de continuidade deste trabalho são:

1) Avaliar as transformações da bactéria *Escherichia coli* e leveduras através de vetores apropriados para cada caso, com vetores controles e promotores específicos, utilizando DODAB como agente carreador dos vetores.

2) Verificar níveis de transfecção e expressão gênica de pSVβ-gal com DODAB como carreador de DNA, utilizando diferentes linhagens celulares como COS-7 e HeLa.

3) Comparar ação do DODAB com aquela de diferentes agentes de transfecção como os comerciais ou o clássico, fosfato de cálcio.

4) Verificar efeito dos tamanhos das vesículas de DODAB na eficiência de transformação de *E. coli*.

5) Determinar o efeito do complexo DODAB/DNA sobre a carga da célula (bactéria) e sua viabilidade.

6) Estudar a interação entre DODAB, DNA e particulados como microesferas de látex ou sílica de diversos tamanhos.

7) Determinar o efeito do tamanho do agregado partícula/DODAB/DNA sobre a eficiência de transfecção em células ou bactérias.

8) Determinação de estabilidade dos glóbulos frente a várias soluções tampão e meios de cultura, através de turbidimetria e também por filtração e análise ao microscópio de campo escuro do material retido sobre a membrana filtrante.

9) Caracterização dos complexos DODAB/nucleotídeo (no caso, DMP) e depois DODAB-DNAs (como de bacteriófagos T4 e λ) através de ressonância paramagnética eletrônica de marcadores de spin incorporados à bicamada e difração de raios X.

10) Caracterizar processos de endocitose ou fusão do glóbulo DNA/lipídio com a membrana da célula através de microscopia de fluorescência e uso de marcadores adequados para células, DNA ou DODAB.

11) Dirigir o complexo DODAB/DNA para interiorização por fibroblastos em cultura por endocitose através da incorporação de LDL (*low density lipoprotein*) às vesículas de DODAB antes de formar o complexo com DNA. Essa proposta se justifica pela alta freqüência com a qual ocorrem os receptores de LDL em linhagens NIH 3T3 (Goldstein, J.L. et al., 1985, Packer, L. & Fleischer, S., 1997).

12) Verificar sob o aspecto físico-químico o tipo de interação existente entre vesículas catiônicas e LDL.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AKAO, T., FUKUMOTO, T., IHARA, H., ITO, A Conformational change in DNA induced by cationic bilayer membranes. **FEBS Lett.**, v.391, p.215-218, 1996.

ARROYO, J., DE LOPEZ, A.C., BERNIK, D.L., DISALVO, E.A. Surface packing of lipid bilayers in the gel sate induced by osmotic stress as measured by the dimerization of Merocyanine 540. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.203, p.106-114, 1998.

AUGUSTO, O.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Introducing model membranes and lipoperoxidation. **Biochem. Educ.**, v.17, n.4, p.209-210, 1989.

BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v.13, n.1, p.238, 1965.

BARTHEL, F., REMY, J.S., LOEFFLER, J.P., BEHR, J.P. Gene-transfer optimization with lipospermine-coated DNA. **DNA Cell. Biol.**, v.12, n.6, v.553-560, 1993.

BEHR, J.P. Gene-transfer with synthetic cationic amphiphiles - prospects for gene-therapy. **Bioconjugate Chem.**, v.5, n.5, p.382-389, 1994.

BEHR, J.P. Synthetic gene transfer vectors. **Accounts Chem. Res.**, v.26, n.5, p.274-278, 1993.

BEHR, J.P., DEMENEIX, B., LOEFFLER, J.P., MUTUL, J.P. Efficient gene-transfer into mammalian primary endocrine-cells with lipopolyamine-coated DNA. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v.86, n.18, p.6982-6986, 1989.

BIRCHALL, J.C., KELLAWAY, I.W., MILLS, S.N. Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes. **Int. J. Pharm.**, v.183, p.195-207, 1999.

BOUKHNIKACHVILI, T., AGUERRECHARIOL, O., AIRIAU, M., LESIEUR, S., OLLIVON, M. VACUS, J. **FEBS Lett.**, v.409, n.2, p.188-194, 1997.

CAMPANHÃ, M.T.N. **Interações entre vesículas catiônicas e superfícies biológicas: lipossomos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) como agentes antimicrobianos**. São Paulo, 2000. 141p. (Tese de Doutoramento - Instituto de Química - USP).

CAMPANHÃ, M.T.N., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **J. Lipid Res.**, v.40, p.1495-1500, 1999.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. **An. Acad. Bras. Ci.**, v.72, n.1, p.30-43, 2000.

*Obs.: Este item foi elaborado baseado em normas da Associação de Normas Técnicas NBR 6023/89 - Referências Bibliográficas

CARMONA-RIBEIRO, AM. Interactions between charged spheric vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.97, p.11843-11846, 1993.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Rev.,** Cambridge, v.21, n.3, p.209-214, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., CASTUMA, C.E., SESSO, A., SCREIER, S. B. Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions. **J. Phys. Chem.,** v.95, p.5361-5366, 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.733, n.1, p.172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., CHAIMOVICH, H. Salt-induced aggregation and fusion of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate vesicles. **Biophys. J.,** v.50, p.621-628, 1986.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., HERRINGTON, T.M. Phospholipid adsorption onto polystyrene microspheres. **J. Colloid Interf. Sci.,** v.156, p.19-23, 1993.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., HIX, S. pH Effects on properties of dihexadecyl phosphate vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.95, p.1812-1817, 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., MIDMORE, B.R. Surface potential in charged synthtetic amphiphile vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.96, n.8, p.3542-3547, 1992a.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., MIDMORE, B.R. Synthetic bilayer adsorption onto polystyrene microspheres. **Langmuir**, v.8, n.3, p.801-806, 1992b.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., ORTIS, F., SCHUMACHER, R.I., ARMELIN, M.C.S. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. **Langmuir**, v.13, n.8, p.2215-2218, 1997.

CARMONA-RIBEIRO, A.M, YOSHIDA, L.S., CHAIMOVICH, H. Salt effects on the stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecyl phosphate vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.89, n.13, p.2928-2933, 1985.

CARVALHO, L.A., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and serum proteins. **Langmuir,** v.14, p.6077-6081, 1998.

CICCARONE, V., ANDERSON, D., LAN, J., SCHIFFERLI, K., JESSE, J. DMRIE-C Reagent for transfection of suspension cells and for RNA transfections. **Focus**, v.17, n.3, p.84-87, 1995.

CICCARONE, V., HAWLEY-NELSON, P., JESSEE, J. Cationic liposome-mediated transfection: effect of serum on expression and efficiency. **Focus**, v.15, n.3, p.80-83, 1993.

DAVE, J., PATEL, H.M. Differentiation in hepatic and splenic phagocytic-activity during reticuloendothelial blockade with cholesterol-free and cholesterol-rich liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.888, n.2, p.184-190, 1986.

DERKSEN, J.T.P., BALDESCHWIELER, J.D., SCHERPHOF, G.L. Invivo stability of ester-linked and ether-linked phospholipid-containing liposomes as measured by perturbed angular-correlation spectroscopy. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.85, n.24, p.9768-9772, 1988.

DUZGUNES, N., GOLDSTEIN, J.A., FRIEND, D.S., FELGNER, P.L. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleyloxy)propil]-N,N,N-trimethylammonium - induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid-vesicles. **Biochemistry**, v.28, n.23, p.9179-9184, 1989.

EASTMAN, S.J., SIEGEL, C., TOUSIGNANT, J., SMITH, AE., CHENG, S.H., SCHEULE, R.K. Biophysical characterization of cationic lipid: Dna complexes. **Biochim. Biophys. Acta** , v.1325, p.41-62, 1997.

FARHOOD, H., SERBINA, N., HUANG, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1235, p.289-295, 1995.

FELGNER, J.H., KUMAR, R., SRIDHAR, C.N., WHEELER, C.J., TSAI, Y.J., BORDER, R., RAMSEY, P., MARTIN, M., FELGNER, P.L. Enhanced gene delivery and mechanism suties with a novel series of cationic lipid formulations. **J. Biol. Chem.,** v.269, n.4, p.2550-2561, 1994.

FELGNER, P.L. Nonviral strategies for gene therapy. **Sci. Amer.,** v.276, n.6, p.102-106, 1997.

FELGNER, P.L., GADEK, T.R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H.W., WENZ, M., NORTHROP, J.P., RINGOLD, G.M., DANIELSEN, M. Lipofection - a highly efficient, lipid-mediated DNA - transfection procedure. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.,** v.84, n.21, p.7413-7417, 1987.

FENDLER, J.H. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization. **Accounts Chem. Res.**, v.13, p.7-13, 1980.

FREZARD, F., GARNIER-SUILLEROT, A. DNA-containing liposomes as a model for the study of cell membrane permeation by anthracycline derivatives. **Biochemistry**, v.30, p.5038-5043, 1991.

FRIEND, D.S.; PAPAHADJOPOULOS, D.; DEBS, R.J. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection madiated by cationic liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1278, p.41-50, 1996.

GAO, X., HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. **Gene Ther.**, v.2, n.10, p.710-712, 1995.

GAO, X., HUANG, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian-cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v.179, n.1, p.280-285, 1991.

GERSHON, H., GHIRLANDO, R., GUTTMAN, S.B., MINSKY, A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. **Biochemistry**, v.32, n.28, p.7143-7151, 1993.

GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., ANDERSON, R.G.W. et al. Receptor-mediated endocytosis-concepts emerging from the LDL receptor system. **Annu. Rev. Cell Biol.,** v.1, p.1-39, 1985.

GREGORIADIS, Gregory. Editorial. **Int. J. Pharm.,** v.162, p.1-3, 1998a.

GREGORIADIS, G. Genetic Vaccines: strategies for optimization. **Pharm. Res.,** v.15, n.5, p.661-670, 1998b.

GUSTAFSSON, J., ARVIDSON, G., KARLSSON, G., ALMGREN, M. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes**, v.1235, n.2, p.305-312, 1995.

HARVIE, P., WONG, F.M.P., BALLY, M.B. Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation. **Biophys. J.**, v.75, p.1040-1051, 1998.

HAWLEY-NELSON, P., CICCARONE, V., GEBEYEHU, G., JESSEE, J., FELGNER, P.L. LipofectAmine™ reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. **Focus**, v.15, n.3, p.73-79, 1993.

HIRSCH-LERNER, D., BARENHOLZ, Y. Hydration of lipoplexes commonly used in gene delivery: follow-up by lalurdan fluorescence changes and quantification by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1461, p.47-57, 1999.

HOPE, M.J., MUI, B., ANSELL, S., AHKONG, Q.F. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (review). **Mol. Membr. Biol.**, v.15, n.1, p.1-14, 1998.

HÖRER, O.L., ENACHE, C. Conformational transitions in polyelectrolyte adsorption. **Biophys. Chem.**, v.54, n.1, p.43-48, 1995.

HUEBNER, S., BATTERSBY, B.J., GRIMM, R., CEVC, G. Lipid-DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy. **Biophys. J.**, v.76, p.3158-3166, 1999.

HUI, S.W., LANGNER, M., ZHAO, Y.L., ROSS, P., HURLEY, E., CHAN, K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. **Biophys. J.,** v.71, n.2, p.590-599, 1996.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and surface forces**. 2.ed. London: Academic Press, 1992, cap. 17.

JÄÄSKELÄINEN, I., MÖNKKÖNEN, J., URTTI, A. Oligonucleotide-cationic liposome interactions. A physicochemical study. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1195, p.115-123, 1994.

JACKSON, S., REBOIRAS, M.D., LYLE, I.G., JONES, M.N. Adsorption of phospholipid-vesicles on solid-surfaces. **Faraday Discuss. Chem. Soc.**, v.81, p.291-301, 1986.

KATZ, D., KRAAIJEVELD, C.A., SNIPPE, H. Synthetic lipoid compound as antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killed-virus väccines. In: **Theory and Practical Application of Adjuvants**. Chichester: Stewart-Tull, D.E.S., Ed.; John Wiley & Sons, 1995.

KENNEDY, M.T., POZHARSKI, E.V., RAKHMANOVA, V.A., MACDONALD, R.C. Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes. **Biophys. J.,** v.78, p.1620-1633, 2000.

KERENZUR, M., BEIGEL, M., LOYTER, A. Insuction of fusion in aggregated and nonagregated liposomes bearing cationic detergents. **Biochim. Biophys. Acta,** v.983, n.2, p.253-258, 1989.

KIKUCHI, I.S., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between DNA and cationic liposomes. **J. Phys. Chem. B**, v. 104, n.13, p.2829-2835, 2000.

KIKUCHI, I.S., VIVIANI, W., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Nucleotide insertion in cationic bilayers. **J. Phys. Chem.A,** v.103, p.8050-8055, 1999.

KOJIMA, H., OHISHI, N., TAKAMORI, M., YAGI, K. Cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer into primary myoblasts. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, v.207, n.1, p.8-12, 1995.

KOLTOVER, I., SALDITT, T. RÄDLER, J.O., SAFINYA, C.R.. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science,** v.281, n.4, p.832-833, 1998.

LAM, A.M.I., CULLIS, P.R. Calcium enhances the transfectionpotency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1463, p.279-290, 2000.

LASIC, D.D., PAPAHADJOPOULOS, D. Liposomes revisited. **Science**, p.267, p.1275-1276, 1995.

LASIC, D.D., STREY, H., STUART, M.C.A., PODGORNIK, R., FREDERIK, P.M. The structure of DNA-liposome complexes. **J. Am. Chem. Soc.,** v.119, n.4, p.832-833, 1997.

LELKES, P.I., MILLER, I.R. Perturbations of membrane structure by optical probes:I. Location and structural sensitivity of Merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. **J. Membr. Biol.,** v.52, p.1-15, 1980.

LESSA, M.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer wetting on polymer surfaces. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.182, n.1, p.166-171, 1996.

LEVENTIS, R., SILVIUS, J.R. Interactions of mammalian-cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1023, n.1, p.124-132, 1990.

LI, S., RIZZO, M.A., BHATTACHARYA, S., HUANG, L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. **Gene Ther.**, v.5, n.7, p.930-937, 1998.

LOEB, A.L., WIERSEMA, P.H., OVERBEEK, J.Th.G. **The electrical double layer around a spherical particle**. Cambridge: M.I.T. Press. Apud: CARMONA-RIBEIRO, A.M., MIDMORE, B.R. Surface potential in charged synthtetic amphiphile vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.96, n.8, p.3542-3547, 1992.

LOEFFLER, J.P., BEHR, J.P. Gene-transfer into primary and established mammalian-cell lines with lipopolyamine-coated DNA. **Methods Enzymol.**, v.217, p.599-618, 1993.

MACARULLA, J.M., MARINO, A. **Bioquímica Cuantitativa**. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 1988, p.62.

MAHATO, R.I., KAWABATA, K., NOMURA, T., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. **J. Pharm. Sci.,** v.84, n.11, p.1267-1271, 1995.

MARTINS, L.M.S., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, AM. Cationic vesicles as bactericides. **Langmuir**, v.13, n.21, p.5583-5587, 1997.

MAY, S., BEN-SHAUL, A. DNA-lipid complexes: Stability of honeycomb-like and spaghetti-like structures. **Biophys. J.,** v.73, n.5, p.2427-2440, 1997.

MAY, S., HARRIES, D., BEM-SHAUL, A. The phase behavior of cationic lipid-DNA complexes. **Biophys. J.,** v.78, p.1681-1697, 2000.

MEL'NIKOV, S.M., MEL'NIKOVA, Y.S., LÖFROTH, J.E. Single-molecule visualization of interaction between DNA and oppositely charged mixed liposomes. **J. Phys. Chem. B**, v.102, p.9367-9369, 1998.

MEL'NIKOV, S.M., SERGEYEV, V.G., YOSHIKAWA, K. Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant. **J. Am. Chem. Soc.**, v.117, p.2401-2408, 1995.

MEL'NIKOV, S.M., SERGEYEV, V.G., YOSHIKAWA, K., TAKAHASHI, H., HATTA, I. Cooperativity or phase transition? Unfolding transition of DNA cationic surfactant complex. **J. Chem. Phys.**, v.107, n.17, p.6917-6924, 1997.

MEL'NIKOVA, Y.S., MEL'NIKOV, S.M., LÖFROTH, J.E Physico-chemical aspects of the interaction between DNA and oppositely charged mixed liposomes. **Biophys. Chem.,** v.81, p.125-141, 1999.

MINAGAWA, K., MATSUZAWA, Y., YOSHIKAWA, K., KHOKHLOV, A.R., DOI, M. Direct observation of the coil-globule transition in DNA molecules. **Biopolymers**, v.34, p.555-558, 1994.

INAGAWA, K., MATSUZAWA, Y., YOSHIKAWA, K., MASUBUCHI, Y., MATSUMOTO, M., DOI, M., NISHIMURA, C., MAEDA, M. Change of the higher order structure of DNA induced by the complexation with intercalating synthetic polymer, as is visualized by fluorescence microscopy. **Nucleic Acids Res.**,.v.21, n.1, p.37-40, 1993.

ITRAKOS, P., MACDONALD, P.M. Nucleotide chain length and the morphology of complexes with cationic amphiphiles: ^{31}P-NMR observations. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1463, p.355-373, 2000.

OGHIMI, S.M. Opsono-recognition of liposomes by tissue macrophages. **Int. J. Pharm.**, v.162, p.11-18, 1998.

ORTARA, R.A., QUINA, F.H., CHAIMOVICH, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester. Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 81, n.4, p.1080-1086, 1978.

ASCIMENTO, D.B., RAPUANO, R., LESSA, M.M., CARMONA-RIBEIRO, AM. Counterion effects on properties of cationic vesicles. **Langmuir**, v.14, p.7387-7391, 1998.

EW, R.R.C. **Liposomes. A practical approach**. Oxford: IRL Press, 1994, 301p.

'BRIEN, R.W., WHITE, L.R. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2**, v.178, n.74, p.1607, 1978.

ACKER, L., FLEISCHER, S. **Biomembranes**. San Diego: Academic Press, 1997.

ANSU, R.B., ARRIO, B., RONCIN, J. FAURE, J. Vesicles versus membrane-fragments in DODAC suspensions. **J. Phys. Chem.**, v.94, n.2, p.796-801, 1990.

ATEL, H.M. Serum opsonins and liposomes - their interaction and opsonophagocytosis. **Crit. Rev. Ther. Drug**, v.9, n.1, p.39-90, 1992.

ATEL, H.M., TUZEL, N.S., RYMAN, B.E. Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. **Biochim. Biophys. Acta**, v.761, n.2, p.142-151, 1983.

ERBAL, B.V. **A practical guide to molecular cloning**. New York: A Wiley-Interscience Publications, 1988, p.414-415.

ITARD, B., OUDRHIRI, N., VIGNERON, J.P., HAUCHECORNE, M., AGUERRE, O., TOURY, R., AIRIAU, M., RAMASAWMY, R., SCHERMAN, D., CROUZET, J., LEHN, J.M., LEHN, P. Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.96,n.6,p.2621-2626,1999.

ROMEGA Transfectam®* Reagent for the transfection of Eukaryotic cells, 9p. Available: ttp://www.promega.com/tbs/tb116/tb116.html [7/02/2000].

RÄDLER, J.O., KOLTOVER, I., SALDITT, T., SAFINYA, C.R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**, v.275, p.810-814, 1997.

RAPUANO. R., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. **J. Colloid Interf. Sci.,** v.193, n.1, p.104-111, 1997.

RAU, D., PARSEGIAN, V.A. Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices-evidence for long-range attractive hydration forces. **Biophys. J.**, v.61, n.1, p.246-259, 1992.

REMY, J.S., SIRLIN, C., VIERLING, P., BEHR, J.P. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. **Bioconjugate Chem.**, v.5, n.6, p.647-654, 1994.

ROERDINK, F.H., REGTS, J., HANDEL, T., SULLIVAN, S.M., BALDESCHWIELER, J.D., SCHERPHOF, G.L. Effect of cholesterol on the uptake and intracellular degradation of liposomes by liver and spleen - a combined biochemical and gamma-ray perturbed angular-correlation study. **Biochim. Biophys. Acta**, v.980, n.2, p.234-240, 1989.

ROSS, P.C., HUI, S.W. Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. **Gene Ther.**, v.6, p.651-659, 1999.

ROUSER, G., FLEISCHER, S., YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatography separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v.5, n.5, p.494-496, 1970.

SAFINYA, C.R., SIROTA, E.B., ROUX, D., SMITH, G.S. Universality in interacting membranes - the effect of cosurfactants on the interfacial rigidity. **Phys. Rev. Lett.,** v.62, n.10, p.1134-1137, 1989.

SALDITT, T., KOLTOVER, R., RÄDLER, J.O., SAFINYA, C.R. Two-dimensional smectic ordering of linear DNA chains in self-assembled DNA-cationic liposome mixtures. **Phys. Rev. Lett.,** v.79, n.13, p.2582-2585, 1997.

SALT, W.G., WISEMAN, D. Relation between uptake of cetyltri-methylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. **J. Pharm. Pharmacology**, v.22, n.4, p.261, 1970.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 2ª ed., Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDRI-GOLDIN, R.M., GOLDIN, A.L., LEVINE, M., GLORIOSO, J. High-efficiency transfer of DNA into eukaryotic cells by protoplast fusion. **Methods Enzymol.**, v.101, p.402-411, Part C, 1983.

SCHALES, O., SCHALES, S.S. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **J. Biol. Chem.**, v.140, p.879-884, 1941.

SCHERPHOF, G., ROERDINK, F., WAITE, M., PARKS, J. Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.542, n.2, p.296-307, 1978.

SCHUBER, F., KICHLER, A., BOECKLER, C., FRISCH, B. Liposomes: from membrane models to gene therapy. **Pure & Appl. Chem.**, v.70, n.1, p.89-96, 1998.

SEMPLE, S.C., CHONN, A., CULLIS, P.R. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. **Biochemistry**, v.35, n.8, p.2521-2525, 1996.

SENIOR, J., CRAWLEY, J.C.W., GREGORIADIS, G. Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous-injection. **Biochim. Biophys. Acta**, v.839, n.1, p.1-8, 1985.

SICCHIEROLLI, S.M., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bacteria flocculation and death by cationic vesicles. **Langmuir**, v. 11, n.8, p.2991-2995, 1995.

SIEBER, Fritz. Yearly Review. Merocyanine 540. **Photochem. and Photobiol.**, v.46, n.6, p.1035-1042, 1987.

SIMÕES, S., SLEPUSHKIN, V., PIRES, P., GASPAR, R., LIMA, M.C.P., DÜZGÜNES, N. Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1463, p.459-469, 2000.

STAMATATOS, L., LEVENTIS, R., ZUCKERMANN, M.J., SILVIUS, J.R. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid-vesicles and biological-membranes. **Biochemistry**, v.27, n.11, p.3917-3925, 1988.

STELMO, M., CHAIMOVICH, H., CUCCOVIA, I.M. Quantitative-determination of alkylammonium amphiphiles using neutral detergents. **J. Colloid Interf. Sci.**, v.117, n.1, p.200-204, 1987.

STERNBERG, B., KEELUNG, H., ZHENG, W., PAPAHADJOPOULOS, D. Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1375, p.24-35, 1998.

STERNBERG, B., SORGI, F.L., HUANG, L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. **FEBS Lett.**, v.356, p.361-366, 1994.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4.ed., New York: W. H. Freeman and Co., 1995, p.49.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1992, p.59-72,559.

SZLEIFER, I., KRAMER, D., BENSHAUL, A., ROUX, D., GELBART, W.M. Curvature elasticity of pure and mixed surfactant films. **Phys. Rev. Lett.**, v.60, n.19, p.1966-1969, 1988.

TALL, A.R., TABAS, I., WILLIAMS, K.J. Lipoprotein-liposome interactions. **Methods Enzymol.**, v.128, p.647-657, 1986.

TAPIAS, G.N., SICCHIEROLLI, S.M., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Escherichia coli*. **Langmuir,** v.10, n.10, p.3461-3465, 1994.

TARAHOVSKY, Y.S., KHUSAINOVA, R.S., GORELOV, A.V., NICOLAEVA, T.I., DEEV, A.A., DAWSON, A.K., IVANITSKY, G.R. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. **FEBS Lett.,** v.390, n.2, p.133-136, 1996.

TEMPLETON, N.S., LASIC, D.D., FREDERIK, P.M., STREY, H.H., ROBERTS, D.D., PAVLAKIS, G.N. Improved DNA: Liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. **Nature Biotechnol.**, v.15, n.7, p.647-652, 1997.

TSURUTA, L.R., QUINTILIO, W., COSTA, M.H.B., CARMONA-RIBEIRO, AM. Interactions between cationic liposomes and an antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. **J. Lipid Res.,** v.38, p.20-28, 1997.

TROS DE ILARDUYA, C., DÜZGÜNES, N. Efficient gene transfer by transferrin lipoplexes in the presence of serum. **Biochim. Biophys. Acta.,** v.1463, p. 333-342, 2000.

VIEWEG, J., BOCZKOWSKI, D., ROBERSON, K.M., EDWARDS, D.W., PHILIP, M., PHILIP, R., RUDOLL, T., SMITH, C., ROBERTSON, C., GILBORA, E. Efficient gene transfer with adeno-associated virus-based plasmids complexed to cationic liposomes for gene therapy of human prostate cancer. **Cancer Res.,** v.55, p.2366-2372, 1995.

VOLKENSHTEIN, M.V. **Biofísica**. Moscou: Editorial Mir, 1985, p.243-276.

WHITE, L.R. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.,** v.73, p.577, 1977. Apud: CARMONA-RIBEIRO, A.M., MIDMORE, B.R. Surface potential in charged synthtetic amphiphile vesicles. **J. Phys. Chem.,** v.96, n.8, p.3542-3547, 1992.

WIERSEMA, P.H., LOEB, A.L., OVERBEEK, J.Th. Calculation of electrophoretic mobility of a spherical colloid particles. **J. Colloid Interf. Sci.,** v.22, v.1, p.78-99, 1966.

XU, Y., HUI, S.W., FREDERIK, P., SZOKA Jr.,F.C. Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. **Biophys. J.,** v.77, p.341-353, 1999.

YAROSLAVOV, A.A., SUKHISHVILI, S.A., OBOLSKY, O.L., YAROSLAVOVA, E.G., KABANOV, A.V., KABANOV, V.A. DNA affinity to biological membranes is enhanced due to complexation with hydrophobized polycation. **FEBS Lett.,** v.384, p.177-180, 1996.

YOSHIKAWA, K., MATSUZAWA, Y., MINAGAWA, K., DOI, M., MATSUMOTO, M. Opposite effect between intercalator and minor groove binding drug on the higher order structure of DNA as is visualized by fluorescence microscopy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v.188, n.3, p.1274-1279, 1992.

YOU, J., KAMIHIRA, M., IIJIMA, S. Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. **J. Biochem.**, v.125, p.1160-1167, 1999.

YU, W., SHIMOYAMA, A., UNEDA, T., OBIKA, S., MIYASHITA, K., DOI, T., IMANISHI, T. Gene transfer mediated by YKS-220 cationic particles: convenient and efficient gene delivery reagent. **J. Biochem.**, v.125, p.1034-1038, 1999.

ZUIDAM, N.J., BARENHOLZ, Y. Characterization of DNA-lipid complexes commonly used for gene delivery. **Int. J. Pharm.**, v.183, p.43-46, 1999.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S) ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO