Débora Levy

Reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas em células de sarcoma uterino humano. Utilização de emulsão lipídica como veículo de oligonucleotídeos antissenso

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2007

*Aos meus pais **Ina** e **Leonardo** pelo
apoio incondicional e por estarem
sempre por perto.*

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Bydlowski pela oportunidade de aprendizado, por me ensinar a seguir minhas metas com o mínimo de desvio possível e principalmente pelas orientações seguras, as quais muito contribuíram para o meu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pelo fornecimento da emulsão lipídica.

À Profa. Dra. Shirley Schreier, pelas horas de discussão, valiosas sugestões e ensinamentos, em físico-química, área que eu não tinha nenhum conhecimento.

Ao Dr. Renato Mortara pela ajuda na aquisição das imagens no microscópio confocal.

À amiga Luciana Ferreira Morganti Maselli, Tia Lú, por me escutar sempre, mesmo quando não queria.

À Andrea Turbuck Celestino pelo companheirismo, amizade e auxílio prestado durante o desenvolvimento desta tese. Sua ajuda foi inestimável.

À Cleide Appolonio, pelo carinho e pela revisão final deste trabalho.

À Dra. Adriana de Aguiar Debes pelo grande conhecimento que você me transmitiu.

Ao Jorge Ruiz pela imensa ajuda, amizade e apoio prestado sempre que precisei.

A Antonio Carlos Magnanelli e a Dra. Estela Novak pelo carinho e atenção que me deram sempre que necessário.

À Debora Deus, quem sempre me auxiliou tanto na preparação da emulsão lipídica, como em qualquer dificuldade laboratorial pela qual passei.

Às colegas de pós-graduação Adriana e Samantha pela angústia e dificuldade que passamos juntas.

Aos estagiários Gustavo, Luana, Kelly, Rafael e Ester por estarem presentes e me auxiliarem em momentos de dificuldades.

Às amigas Bárbara e Graciela, por estarem presentes, embora em diferentes momentos, me obrigaram a buscar um conhecimento totalmente novo.

A Regina Gil, pelos momentos de descontração e alegria, em períodos difíceis.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, sem o qual, não seria possível realizar este trabalho.

Aos demais colegas da Superintendência de Pesquisa da Fundação Pró-Sangue, pela colaboração, coleguismo e respeito.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente Angélica e Rose, pela atenção e dedicação dispensada em todos os momentos, durante o curso de pós-graduação.

Enfim, a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, a minha formação como pesquisadora e ser humano, os sinceros agradecimentos.

“Eu sou eu mais as minhas
circunstâncias”

José Ortega y Gasset

“O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus
sonhos”

Eleanor Roosevelt

Este trabalho foi realizado com
auxílio de bolsa FAPESP processo
03/02947-3

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Lipoproteína de Baixa Densidade.....	5
2.2 Emulsão lipídica com características funcionais da LDL (LDE)..	7
2.3 Oligonucleotídeos antissenso (OAS).....	9
2.4 Vetores de oligonucleotídeos antissenso.....	13
2.4.1 Sistemas de entrega de oligonucleotídeos antissenso que agem por endocitose.....	14
2.4.2 Sistemas de entrega de oligonucleotídeos antissenso que agem na membrana plasmática.....	16
2.5 LDE como transportador de oligonucleotídeos antissenso.....	18
2.6 Resistência a múltiplas drogas.....	18
2.6.1 P-glicoproteína.....	20
2.7. Terapia gênica utilizando MDR1 como alvo.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
4. MÉTODOS.....	28

4.1	Preparo de lipoproteínas humanas (HDL e LDL), soro deficiente de lipoproteínas (SDL) e nanoemulsão lipídica (LDE).....	29
4.1.1	Preparo de LDL e HDL plasmáticas humanas.....	29
4.1.2	Preparo de soro deficiente de lipoproteína (SDL).....	30
4.1.3	Eletroforese de lipoproteínas.....	31
4.1.4	Preparo de LDE marcada com [³ H].....	32
4.2	Estudo da capacidade de ligação entre oligonucleotídeo antissenso e emulsão lipídica (LDE) por fluorescência.....	32
4.3	Análise do tamanho de emulsão lipídica (LDE).....	33
4.4	Estudos dos receptores de LDL.....	34
4.4.1	Cultura de células de sarcoma uterino sensível e resistente a quimioterápicos.....	34
4.4.2	Extração de RNA total.....	34
4.4.3	Análise de receptores de LDL por RT-PCR.....	35
4.5	Ligação, Inteorização e distribuição complexo oligonucleotídeo antissenso/ LDE.....	36
4.5.1	Ensaio de ligação de superfície e internalização de [³ H]LDE em células de sarcoma uterino resistente à doxorubicina.....	36
4.5.2	Interiorização do complexo oligo/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes.....	37

4.5.3 Distribuição do complexo oligo/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes.....	38
4.6 Teste de citotoxicidade das lipoproteínas, da LDE pré incubada com HDL e dos oligonucleotídeos.....	39
4.7 Análise semi-quantitativa da expressão de P-glicoproteína por RT-PCR.....	39
4.8 Verificação da sensibilidade das células tratadas em concentrações crescentes de doxorubicina.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 Análise de lipoproteínas no plasma, nas frações lipoprotéicas e no soro deficiente de lipoproteínas.....	43
5.2 Capacidade de ligação aproximada entre oligonucleotídeo antissenso (OAS) e emulsão lipídica (LDE).....	46
5.3 Estimativa do tamanho da LDE.....	52
5.4 Análise do receptor de LDL por RT-PCR.....	54
5.5 Ligação, Interiorização e distribuição do complexo oligonucleotídeo antissenso/ LDE.....	56
5.5.1 Ensaio de ligação de superfície e internalização de [³ H]LDE em células de sarcoma uterino resistente a doxorubicina.....	56
5.5.2 Interiorização do complexo oligo/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes.....	58

5.5.3	Análise da distribuição do oligonucleotídeo antissenso em células de sarcoma uterino resistentes por microscopia confocal.....	60
5.6	Análise da citotoxicidade das lipoproteínas e do oligonucleotídeo antissenso.....	62
5.6.1	Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).....	62
5.6.2	LDE pré-incubada com HDL.....	63
5.6.3	Análise da citotoxicidade dos oligonucleotídeos.....	64
5.7	Expressão do gene MDR1 analisada por RT-PCR semi-quantitativo.....	66
5.7.1	Semi-quantificação da expressão do gene MRD1.....	66
5.7.2	Verificação da reversão do fenótipo MDR1.....	69
5.8	Verificação da sensibilidade das células tratadas com o complexo OAS/LDE a concentrações crescentes de doxorubicina.....	73
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONCLUSÕES.....	88
8.	REFERÊNCIAS.....	90

Lista de Abreviaturas

β_2 MG	β_2 -microglobulina
μ l	Microlitro
μ m	Micromolar
ABR	Região de bandeamento anormal
ACAT	Acil CoA: colesterol aciltransferase
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
Apo	Apolipoproteína
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
Ci	Curie, unidade de radioatividade
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Dietilpirocarbonato
DM	Cromossomo duplo minuto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dox	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramma
HCl	Cloreto de sódio
HDL	Lipoproteína de alta densidade

HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase
HSR	Região de coloração homogênea
Kb	Kilobase
KBr	Brometo de potássio
KDa	KiloDalton
LDE	Nanoemulsão lipídica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr	Receptor de LDL
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LR11	Proteína da família de receptores de LDL
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL
M	Molar
MDR	Resistência a múltiplas drogas
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
MRP	Proteína associada ao MDR
MTT	Methyl Thiazolyl Blue
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro

OAS	Oligonucleotídeo antisense
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Fosfatidilcolina
P-gp	P-glicoproteína
PM	Padrão de peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribinucleico
Rnase H	Ribonuclease H
RT-PCR	Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase
SDL	Soro deficiente de lipoproteína
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
Tris	hidroximetilaminometano
US	Unidade padrão
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de Figuras

Figura 1 - (A) A LDL se ligando ao seu receptor em uma célula normal.

Em amarelo, a porção proteica apo B-100. (B) A LDL se ligando ao seu receptor em uma célula neoplásica, onde ocorre aumento da expressão desses receptores. (C) A LDE se ligando ao receptor de LDL em uma célula neoplásica, com maior afinidade que a LDL natural. Em vermelho, a porção protéica apo E..... 9

Figura 2 - Estrutura da P-glicoproteína..... 21

Figura 3 - Eletroforese de lipoproteínas em acetato de celulose. **1:** Plasma; **2:** HDL; **3:** LDL; **4:** Soro Deficiente de Lipoproteínas (SDL)..... 43

Figura 4 - Espectro de emissão de oligo complexado a diferentes concentrações de LDE..... 47

Figura 5 - Espectro de emissão de diferentes concentrações de LDE..... 48

Figura 6 - Concentração de fosfatidilcolina da LDE com o valor máximo de fluorescência de cada espectro sem a interferência do espalhamento de luz da LDE..... 50

Figura 7 - Divisão de F (valor máximo de fluorescência das diferentes titulações de Oligo/LDE) por Fo (valor máximo de fluorescência do Oligo sem a presença de

LDE).....	51
Figura 8 - Distribuição multimodal de LDE.....	53
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR da curva de LDLr de sarcoma uterino resistente. β_2 MG: β_2 -microglobulina, PM: padrão de peso molecular, 1: 0hs, 2: 24hs, 3: 48hs, 4: 72hs de carenciamento (N=3).....	54
Figura 10 - Análise densitométrica da banda que corresponde ao produto de amplificação do gene LDLr em relação a do produto de β_2 -microglobulina (N=3).....	55
Figura 11 - Ligação e Internalização da [3 H]LDE pelo receptor de LDL.....	58
Figura 12 - Análise de internalização do oligonucleotideo através de microscopia de fluorescência.As células se encontramvamos subconfluentes. A: Células incubadas com oligo em meio com SFB; B: Células incubadas com oligo em meio com LPDS; C: Complexo oligo/LDE em meio com LPDS e D: Complexo oligo LDE preincubado com HDL em meio com LPDS.....	59
Figura 13 - Imagens obtida pelo microscópio confocal, após incubação com complexo OAS/LDE em células de sarcoma uterino resistente. A: Imagem da sobreposição da fluorescência do OAS com a fluorescência do núcleo após 24 horas de	

incubação. B: Imagem das células em contraste de fase após 24 horas de incubação. C: Imagem da sobreposição da fluorescência do OAS com a fluorescência do núcleo após 48 horas de incubação. D: Imagem das células em contraste de fase após 48 horas de incubação.....	61
Figura 14 - Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de LDL em células de sarcoma uterino resistentes (N=3).....	62
Figura 15 - Citotoxicidade de LDE pré-incubada com HDL em células de sarcoma uterino resistente (N=3).....	63
Figura 16 - Citotoxicidade de OAS em células de sarcoma uterino resistente. A: AS1; B: AS2 (N=3).....	64
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs totais das células de sarcoma uterino, em cultura S: sensível, R: resistente, PM: padrão de peso molecular (λ DNA cortado pela enzima hind III)	66
Figura 18 - Análise densitométrica da banda 28S (N=2).....	67
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR da curva de quantificação da expressão do gene MDR1. PM: padrão de peso molecular, 1: 0%, 2: 25%, 3:	

50%, 4: 75% e 5: 100% de expressão (N=3).....	68
Figura 20 - Análise densitométrica da banda que corresponde ao produto de amplificação do gene MDR1 em relação à do produto de β_2 -microglobulina (N=3).....	69
Figura 21 - Análise comparativa dos diferentes tipos de tratamentos, com as várias condições de pré-incubação nos tempos de: 24, 48 e 72 horas.....	72
Figura 22 - Citotoxicidade de doxorubicina em células de sarcoma uterino resistente a múltiplas drogas. A: as células foram previamente incubadas com 0,4 μ M de oligonucleotídeo antissenso, 0,7 μ M de LDE e 47 μ g/ml de HDL. B: as células foram previamente incubadas 0,7 μ M de LDE e 47 μ g/ml de HDL (n=3).....	73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentração de colesterol e triacilgliceróis em plasma, LDL, HDL e SDL.....	44
Tabela 2 - Concentração de proteínas totais nas preparações de LDL, HDL e SDL.....	45
Tabela 3 - Diâmetro médio e polidispersidade da LDE	52
Tabela 4 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 24 horas de incubação com diferentes meios.....	70
Tabela 5 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 48 horas de incubação com diferentes meios.....	70
Tabela 6 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 72 horas de incubação com diferentes meios.....	71

Resumo

Levy D. Reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas em células de sarcoma uterino humano. Utilização de emulsão lipídica como veículo de oligonucleotídeos antissenso [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 110 p.

O objetivo deste trabalho foi estudar a utilização de uma nanoemulsão lipídica (LDE) como vetor de oligonucleotídeos antissenso (OAS). A LDE é uma nanoemulsão constituída por 48% de éster de colesterol, 47,8% de fosfolípidos, 2,3% de triglicérides e 1,9% de colesterol não-esterificado. É capaz de adquirir apoE de HDL e, desta forma, a emulsão pode interagir com o receptor B/E. O comportamento metabólico da LDE se assemelha ao da LDL. OAS agem como inibidores da função de genes, ligando-se à fita oposta (complementar) do RNA mensageiro (mRNA) ou à dupla fita do DNA. Previnem que o mRNA codifique uma proteína funcional. Os mecanismos celulares de resistência a drogas representam diversas formas de proteção da célula e do organismo e estão presentes na maioria das células normais, exercendo funções fisiológicas. Infelizmente, muitos tumores utilizam esses mecanismos para sua própria proteção. A proteína codificada pelo gene MDR1 (ABCB1), a P-gp, é uma glicoproteína de membrana com peso molecular de 170Kda, que funciona como uma bomba orgânica catiônica. Neste trabalho foi observado que o OAS se ligam à LDE, sendo a constante de ligação de $4,2 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$. O complexo OAS/LDE foi capaz de se ligar especificamente ao receptor de LDL e através desta via ser internalizado, pelas células de sarcoma uterino resistentes a doxorrubicina. Os OAS apresentaram após 24 horas distribuição citoplasmática e nuclear e após 48 horas, somente distribuição citoplasmática. Utilizando-se dois diferentes OAS, verificou-se que ambos foram capazes de inibir (70%) a expressão do gene de resistência a múltiplas drogas após 48 horas de incubação, tornando as células mais susceptíveis à ação da doxorrubicina. Assim, o complexo OAS/LDE é um sistema potencialmente promissor para ser utilizado em terapia gênica.

Descritores: 1. Oligonucleotídeos anti-senso, 2. Resistência a múltiplas drogas, 3. Genes MDR, 4. Inativação gênica, 5. Vetores genéticos, 6. Emulsões

Summary

Levy, D. Reversion of the multiple drug resistance phenotype in a human sarcoma cell line. Lipid emulsion as antisense oligonucleotide vector [thesis]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2007. 110 p.

The objective of this study was to evaluate the usefulness of a nanolipid emulsion (LDE) as a vector to carry antisense oligonucleotides (OAS). LDE is a nanoemulsion consisting of 48% cholesterol esters, 47,8% phospholipid, 2,3% triglycerides and 1,9% unesterified cholesterol. It is able to obtain apoE from HDL and interact with B/E receptor. The metabolic behavior of LDE is similar to LDL. OAS are able to inhibit specific gene expression since they bind to a complementary sequence in the mRNA or in the DNA. This binding impairs the synthesis of a functional protein. The cell resistance mechanisms are present in most of normal cells, been involved in physiological process. Tumors are able to use these mechanisms to their own protection. The protein P-gp (MDR1 gene) is a glycoprotein with 170Kda that works as an organic cationic pump. We have observed that LDE was able to bind to the OAS; the binding constant was $4,2 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$. The complex was shown to bind to LDL receptors and then been internalized into a human sarcoma cell line resistant to doxorubicine. After 24 hours the complex have shown cytoplasmatic and nuclear distribution, after 48 hours only cytoplasmatic distribution was observed. Two OAS were used. Both OAS strongly inhibited (by 70%) the cell MDR-1 gene expression after 48 hours of incubation and cells turned out to be more susceptible to doxorubicine action. Therefore, OAS/LDE is promising complex to be used in gene therapy studies.

Discriptors: 1. Antisenso oligonucleotides, 2. Multiple drug resistance, 3. Genes MDR, 4. Gene silecing, 5. Genetic vectors, 6. Emulsion

1. Introdução

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas pelas células tumorais é um fenômeno bastante comum. Dentre os mecanismos de resistência descritos, o principal é a expressão da P-glicoproteína (P-gp), uma glicoproteína de membrana de cerca de 170 kDa, que promove o efluxo celular de drogas, diminuindo a sua ação terapêutica. O aumento da expressão da Pgp relaciona-se com o aumento no número de cópias do gene responsável ou à alteração de seu controle transcripcional. Recentemente, descreveu-se a utilização de oligonucleotídeos antissenso (OAS) para inibir a expressão de genes específicos, dentre eles o gene MDR1. Os OAS são capazes de se ligar a um mRNA com seqüência complementar, impedindo sua tradução para proteína. Geralmente, os OAS são introduzidos nas células por técnicas como permeabilização da membrana ou utilização de veículos lipídicos como lipossomos catiônicos. Todas essas técnicas, porém, não são capazes de resolver uma das mais difíceis questões: como fazer com que os OAS sejam conduzidos somente às células-alvo?

Baseados no fato de que células tumorais possuem uma taxa de multiplicação mais elevada e apresentam, em sua maioria, um maior número de receptores para LDL, a principal lipoproteína plasmática transportadora de colesterol, propusemos que emulsões lipídicas (LDE), com características semelhantes à LDL, poderiam ser utilizadas como vetores para a entrega seletiva de oligonucleotídeos às células, via receptor de LDL. Neste projeto, estudou-se o uso destas emulsões lipídicas como vetores para reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas, em linhagens celulares de sarcoma

uterino humano, através da utilização de OAS. Com esta estratégia, pretende-se utilizar a LDE para veicular OAS de maneira seletiva a estas células e nelas interferir com a expressão gênica do gene MDR1, visando futura aplicação *in vivo*.

2. Revisão da Literatura

2.1 Lipoproteína de Baixa Densidade

Lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal transportadora de colesterol na circulação humana e tem um papel chave na transferência de colesterol e seu metabolismo. Características tanto físicas quanto fisiológicas, levaram à convenção que define partículas de LDL como partículas de lipoproteínas com limites de densidade entre 1,019 a 1,063g/ml. LDL forma um grupo heterogêneo de partículas que variam em tamanho, composição e estrutura (Henova *et al.*, 2000).

É constituída de um núcleo com cerca de 1500 moléculas de colesterol esterificados e ácidos graxos de cadeias longas, circundadas por uma monocamada lipídica composta por cerca de 800 fosfolipídeos e 500 moléculas não esterificadas de colesterol. Uma única molécula protéica organiza a partícula (apoproteína B), que é responsável pela ligação específica de LDL às proteínas receptoras de superfície (Alberts *et al.*, 2006).

Apolipoproteínas determinam a absorção de lipoproteínas devido a sua interação com receptores de lipoproteínas na superfície celular. Estes receptores ligam-se a lipoproteínas ricas em colesterol que contém apolipoproteína B-100 e/ou E, e mediam a sua endocitose (Willnow, 1999).

Células requerem colesterol para a síntese de membrana plasmática. Apesar das células serem capazes de sintetizar colesterol através da acetil-CoA, este é sintetizado em pequenas quantidades (Goldstein *et al.*, 1983).

A captação da LDL pelo fígado e outros tecidos ocorre através da interação com os LDLr. Esses receptores encontram-se em regiões específicas

da membrana celular denominadas "coated pits" (depressões cobertas), que são revestidas por proteínas denominadas clatrin. Após a interação da lipoproteína com o receptor, essa região sofre invaginação, formando vesículas endocíticas. O envoltório de clatrina dissocia-se e ocorre fusão de várias vesículas, formando os endossomos. A diminuição de pH nesses endossomos promove o desligamento do complexo receptor e LDL com o retorno do receptor à superfície celular. Segue-se a fusão de lisossomos com a vesícula e a degradação dos seus componentes. O éster de colesterol é hidrolisado pela lipase ácida, liberando colesterol livre que será utilizado no metabolismo celular (Goldstein *et al.*, 1979).

Quando a concentração celular de colesterol está elevada, ocorre diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase. A HMG CoA redutase é a enzima que catalisa a etapa chave da biossíntese de colesterol. Ocorre ainda redução da expressão dos receptores de superfície de LDL (LDLr). Finalmente, o excesso de colesterol intracelular ativa a ação da enzima acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) que esterifica o colesterol e o estoca em forma de gotículas (Bilheimer, 1988). Quando as células estão privadas de colesterol, tem-se o aumento de expressão dos receptores de superfície da LDL e aumento da atividade da HMG CoA redutase.

O receptor de LDL (LDLr) é uma proteína monomérica de 160kDa (produto do gene ABCA1), que pertence à superfamília de receptores de LDL (Rhainds & Brissette, 1999). Os receptores expressos em tecidos de mamíferos que pertencem a esta família são: receptor VLDL (very low density lipoprotein),

receptor B/E de apoE, proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP), LR11 e gp 330/megalina. Estes receptores exibem estrutura similar, incluindo as essenciais para função de receptor por endocitose (Ninpf & Schneider, 2000).

Células cancerígenas apresentam uma maior captação de LDL por possuírem um número maior de receptores em relação a células normais (Ho *et al.*, 1978; Mosley *et al.*, 1981). Estas células proliferam rapidamente, necessitando de uma maior demanda para a síntese de membranas, tanto plasmática como a nuclear e mitocondrial. O aumento de receptores para LDL em células neoplásicas pode atingir de 3 a 100 vezes o número das células normais (Kritchevsky *et al.*, 1991).

Baseado na necessidade excessiva das células por colesterol e, conseqüentemente, a absorção seletiva de LDL por células tumorais, surgiu a possibilidade de utilizar a LDL como vetor de quimioterápicos (Firestone, 1994). Isto poderia aumentar o efeito antineoplásico, enquanto reduziria os efeitos tóxicos em células normais, devido a absorção seletiva de LDL pelas células tumorais. O princípio de utilizar LDL como vetor de drogas, foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*. Porém, a necessidade de isolar LDL de plasma humano, dificulta a sua aplicação farmacêutica (Rensen *et al.*, 1997).

2.2 Emulsão lipídica com características funcionais da LDL (LDE)

A LDE é uma nanoemulsão constituída por 48% de éster de colesterol, 47,8% de fosfolipídeos, 2,3% de triglicérides e 1,9% de colesterol não-esterificado (Maranhão *et al.*, 1997).

Maranhão *et al.* (1993) demonstraram que a LDE é capaz de adquirir apoE de HDL e, desta forma, a emulsão pode interagir com o receptor B/E. O comportamento metabólico da LDE se assemelha ao da LDL, sendo o fígado o principal sítio de retirada de LDE da circulação.

A via de internalização celular é através de receptor de LDL. Em pacientes com hipercolesterolemia familiar, a remoção plasmática de LDE é pronunciadamente reduzida, quando comparada com indivíduos normais. Estes resultados eram esperados devido à presença de receptores B/E defeituosos nesta doença (Roland, 1991). Em outro estudo, foi analisado o caminho inverso, utilizando pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfocítica aguda (LLA); a LMA apresenta número de receptores de LDL aumentados, enquanto que na LLA o número de receptores continua normal. Conforme esperado, a LDE foi removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA (Maranhão *et al.*, 1994).

A LDE é estável, pelo menos por um mês, quando mantida a 4°C. A adição de anti-oxidantes pode aumentar ainda mais a sua estabilidade (Maranhão *et al.*, 1994). Não apresenta citotoxicidade ou inumogenicidade e pode ser produzida com materiais sintéticos (Ades, 2001). A LDE é um dispositivo adequado para explorar a via de endocitose mediada por receptor de LDL, como um portão para entrega às células cancerígenas (figura 1).

Figura 1 - (A) A LDL se ligando ao seu receptor em uma célula normal. Em amarelo, a porção protéica apo B-100. (B) A LDL se ligando ao seu receptor em uma célula neoplásica, onde ocorre aumento da expressão desses receptores. (C) A LDE se ligando ao receptor de LDL em uma célula neoplásica, com maior afinidade que a LDL natural. Em vermelho, a porção protéica apo E (Vasconcellos, 2006)

2.3 Oligonucleotídeos antissenso (OAS)

O primeiro oligonucleotídeo contra uma seqüência de genes definida, foi sintetizado em 1967 por Belikova. O próximo passo foi a inibição da tradução do mRNA por oligonucleotídeos sintéticos em um sistema de tradução de proteínas. Aproximadamente 10 anos depois, Zamecnik e Stephenson em 1978, demonstraram que um oligonucleotídeo complementar a seqüência 3' terminal do vírus de sarcoma Rous podia inibir a replicação viral em um sistema *in vitro*. Estes foram os primeiros a propor a possível utilização de OAS como

moléculas terapêuticas. Em 1998, a primeira droga antissenso, “VitraveneTM” foi aprovada pelo FDA (“United States Food and Drug Administration”). O Vitravene é utilizado no tratamento da retinite causada por citomegalovírus em imunodeprimidos (Pirollo *et al.*, 2003).

O princípio básico para escolher uma sequência de OAS é encontrar o balanço entre conferir suficiente afinidade e especificidade ao alvo e manter propriedades físico-químicas, que garantam penetração celular e concentração adequada à atividade biológica desejada (Rendeti *et al.*, 2001).

OAS agem como inibidores da função de genes, ligando-se à fita oposta (complementar) do RNA mensageiro (mRNA) ou à dupla fita do DNA. Previnem que o mRNA codifique uma proteína funcional (Uhlmann & Peyman, 1990).

OAS podem bloquear a expressão gênica através de vários mecanismos distintos: (a) degradação do mRNA complementar mediada por RNase H (Walder & Walder, 1988); (b) interferência no “splicing” do pré-RNA (Kulka *et al.*, 1989); (c) Inibição da maquinaria de tradução através de ligação ao sítio 5'-cap ou por inibição da região de tradução, sem causar degradação do mensageiro (Boiziau *et al.*, 1991).

A RNase H é uma enzima que degrada a fita de RNA de uma dupla fita RNA-DNA híbrida. Oligonucleotídeos com propriedades parecidas com as do DNA podem ativar a RNase H (Crooke, 1999).

A sequência apropriada do oligonucleotídeo antissenso pode influenciar a expressão gênica através de efeitos na estabilidade gênica, na transcrição, no processamento do mensageiro ou na tradução. Os principais problemas

encontrados na utilização de terapia por OAS, é a baixa especificidade, problema de produção em larga escala e o potencial de ação dos OAS (Alahari *et al.*, 1996).

OAS de fosfodiéster, apesar de serem facilmente sintetizados, apresentam baixa permeabilidade celular, são biologicamente instáveis, apresentam rápida remoção plasmática e os produtos de sua degradação são potencialmente tóxicos.

Para aumentar a estabilidade contra digestão por nucleases, muitas modificações químicas foram testadas. Estas modificações incluem o uso de 2'-*o*-metil, 2'-*o*-(2 methoxy-etil) oligonucleotídeo, α -anomerico ou "locked nucleid acid" (LNA) oligonucleotídeo. Modificações do esqueleto de fosfato como ácido nucléico peptídico (peptide nucleid acid – PNAs) e morfolonofosforodiamidatos, e alteração da ligação fosfodiéster por fosforotioato, metilfosfonatos e fosforomidatos. Todas estas modificações aumentam a estabilidade dos oligonucleotídeos em sistemas biológicos (Dias & Stein, 2002).

A modificação mais comum nos OAS é a alteração das ligações fosfodiéster em fosforotioato. Nesta alteração, um dos oxigênios do fosfato é substituído por um átomo de enxofre. Como resultado os OAS estão melhor protegidos contra a quebra, tanto por exonucleases como por endonucleases (Kronenwett & Haas, 1998).

A utilização dos OAS está também limitada pela sua natureza polianiônica, que leva à interações não específicas com moléculas catiônicas

extra e intracelular e, na maioria dos casos, seu potencial imunogênico (Rendeti *et al.*, 2001). As cargas dificultam a difusão passiva pela membrana, o que não acontece com metilfosfonatos e seus derivados. A absorção de OAS parece ser primariamente um processo ativo dependente de tempo, concentração, energia e temperatura (Gewirtz *et al.*, 1998).

Os OAS livres entram nas células através de endocitose e se acumulam no complexo endossomo-lisossomo, independente se o OAS contém ou não carga. Parte dos OAS são liberados do endossomo e entra no citoplasma, por mecanismos não definidos. Uma vez no citoplasma o OAS pode rapidamente entrar e se acumular no núcleo, permitindo interação com RNA nuclear. O OAS, inicialmente no compartimento endossomo-lisossomo, representa um sítio farmacologicamente não-produtivo. Agentes ou técnicas que promovem a liberação do OAS do lisossomo aumentam o efeito farmacológico das moléculas antissenso. Este parece ser o motivo porque OAS livre não é efetivo, mas passa a ser efetivo na presença de um facilitador ou vetor (Juliano *et al.*, 1999).

Está sendo explorado o potencial dos OAS como agentes terapêuticos contra infecções virais, doenças cardiovasculares, desordens inflamatórias, doenças hematológicas e câncer. Vários métodos de entrega, como lipossomos, dendrímeros e carregadores peptídicos, vêm sendo desenvolvidos (Pirollo *et al.*, 2003).

2.4 Vetores de oligonucleotídeos antissenso

Apesar da seleção apropriada da sequência alvo, a absorção celular de OAS sintéticos é de grande importância e um dos fatores limitantes quanto a eficácia (Kronenwett & Haas, 1998). Para exercer o seu efeito farmacológico e biológico, OAS devem entrar nas células e interagir com o pré-RNA ou o mRNA, no núcleo e no citoplasma (Juliano *et al.*, 1999).

É essencial que estas moléculas atravessem a membrana plasmática, para alcançar seus alvos de ação. A membrana plasmática das células vivas tem uma estrutura dinâmica que é relativamente lipofílica. Como resultado, isto restringe a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e com carga. A maioria das moléculas genéticas tem dificuldade de passar pela membrana plasmática sem um sistema de entrega gênica (Khalil *et al.*, 2006).

In vitro, OAS livre (que não utilizam vetores), são fracamente internalizados pelas células. É necessária uma grande quantidade para obter atividade antissenso. Vetores melhoram a internalização dos OAS, alteram sua distribuição intracelular e aumentam sua atividade (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000).

Na terapia gênica, inicialmente foram utilizados vetores virais. Os principais vírus utilizados são os retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e vírus do herpes simples (Friedmann, 1997). Vetores virais permitem altas taxas de transfecção e rápida transcrição do material inserido no genoma viral. Porém, a utilização de vírus na terapia gênica pode ser limitada por vários fatores. A questão de segurança aumentou devido a morte de pacientes,

durante os estudos clínicos que investigavam o potencial da terapia gênica utilizando vetores virais (Tiera *et al.*, 2006). Terapia gênica utilizando vetores virais é limitada a pequenas seqüências de DNA que podem ser inseridos no genoma viral e a dificuldade de produção em larga escala. Vírus apresentam uma variedade de problemas ao paciente como toxicidade, resposta imune e inflamatória. Efeitos de mutagênese insercional e efeito oncogênico podem ocorrer quando utilizados *in vivo* (Tiera *et al.*, 2006).

Houve um grande interesse na utilização de vetores não virais baseados em lipídeos, polímeros ou a combinação de ambos (DeLong *et al.*, 1999). Vetores não-virais têm a vantagem de serem simples de utilizar, e é fácil produzi-los em larga escala. Porém, têm baixa eficiência quando comparados aos vetores virais (Khalil *et al.*, 2006).

2.4.1 Sistemas de entrega de oligonucleotídeos antissenso que agem por endocitose

Vários sistemas vêm sendo desenvolvidos para a entrega de drogas aplicadas a vetores de OAS, entre eles as nanopartículas e micropartículas. Eles têm a função de proteger OAS contra nucleases e aumentar a absorção celular.

O termo nanopartícula é geralmente utilizado para descrever partículas coloidais sólidas entre os tamanhos 10 a 100nm. Nanopartículas biodegradáveis, baseadas em poli-isohexilcianoacrilato representam um eficiente sistema de vetor. Podem, também, estar associados a polímeros

catiônicos, que levam ao aumento da absorção celular. (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000).

Entre as micropartículas encontram-se os lipossomos. Os lipossomos são partículas vesiculares coloidais. São constituídas por fosfolipídeos e colesterol. Podem ser divididas em vesículas unilamelares pequenas, vesículas unilamelares grandes, vesículas unilamelares gigantes e vesículas multilamelar (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000).

Os OAS podem ser encapsulados no interior do lipossomo ou se ligar à superfície do lipossomo através de interação eletrostática. Lipossomos aniônicos são utilizados para encapsular o OAS. Estes podem ser compostos por fosfatidilserina e utilizados em cultura celular na presença de Ca^{2+} . A fusão com a membrana celular é realizada através da utilização de polietileno glicol, em meio de cultura sem a presença de soro fetal, o que limita sua utilização (Burch & Mahan, 1991).

Os ácidos nucleicos são carregados negativamente e interagem eletrostaticamente com os lipossomos catiônicos. O sistema é obtido simplesmente pela mistura dos componentes. Bennet *et al.* (1992) modificou as perspectivas dos lipossomos catiônicos através da introdução do reagente LipofectinTM. Este altera a distribuição intracelular. O OAS inicialmente parece se difundir no citoplasma da célula e rapidamente acumular no núcleo, variando a distribuição celular obtida com oligonucleotídeos livres. A eficiência obtida levou ao desenvolvimento de novas formulações de lipídeos catiônicos, com

intenção de reduzir a toxicidade dos sistemas de vetores (Lappalainen *et al.*, 1994).

Outra estratégia para aumentar absorção e seletividade, consiste na conjugação de grupos lipofílicos e/ou ligantes que são reconhecidos por proteínas ou receptores de membrana. Necessitam de modificação química para a preparação destes OAS modificados (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000). Resíduos de colesterol estão sendo conjugados aos OAS naturais ou OAS derivados, com aumento de absorção celular em todos os casos (Akhtar & Juliano, 1992; Clarenc *et al.*, 1993).

2.4.2 Sistemas de entrega de oligonucleotídeos antissenso que agem na membrana plasmática

A utilização de absorção mediada por endocitose é uma via eficiente de absorção celular, mas as moléculas internalizadas apresentam pouco acesso aos sítios alvos, como o núcleo. Portanto, desviar da via de endocitose e realizar a entrega de genes no citossol, utilizando outras vias, pode ser vantajoso (Khalil *et al.*, 2006).

Uma solução para evitar a via de endocitose é a modulação da permeabilidade da membrana plasmática, através do aumento da difusão passiva dos OAS que conferem acesso direto ao citoplasma (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000).

Microinjeção é uma técnica que permite a entrega rápida de genes para o citosol ou para o núcleo. É injetado o gene de interesse, diretamente nas células alvo, utilizando pipetas capilares (Khalil *et al.*, 2006).

Permeabilização é utilizada para induzir canais transmembrânicos ou grandes aberturas na membrana plasmática, que permitem a entrada de moléculas grandes. Os peptídeos são derivados do vírus influenza, e levam a fusão do envelope viral com a membrana endossomal. (Parente *et al.*, 1990). Os peptídeos formam complexos com ácidos nucleicos e apresentam fusão a membrana e permeabilização ativa quando expostos a pH neutro, (Legendre *et al.*, 1997).

Outra forma acessível é tirar vantagem da habilidade de formação de poro transmembrânico da toxina bacteriana estreptolisina O, utilizada para controlar a permeabilidade da membrana celular citoplasmática (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000). Spiller e Tidd (1995), demonstraram que células leucêmicas KY01 acumulavam níveis de OAS intracelular 100 vezes maior que as não tratadas com a toxina bacteriana estreptolisina O, sendo que a localização nuclear era evidente.

Na eletroporação, um campo elétrico aumenta a permeabilidade da membrana celular para facilitar a introdução de plasmídeos nas células. Utilizando este método, aumenta-se entre 10 a 100 vezes a expressão do gene em comparação com a administração de OAS livre (Kaned & Tabata, 2006).

As técnicas de microinjeção, permeabilização e eletroporação são extremamente invasivas e são pouco utilizadas como vetores para terapia gênica *in vivo*.

2.5 LDE como transportador de oligonucleotídeos antissenso

Bydlowski *et al.* (1995), tentaram utilizar a LDE como vetor para o transporte de oligonucleotídeo antissenso fosforotioato. Demonstrou-se que a LDE não era capaz de se ligar ao OAS. Com o avanço da tecnologia de produção de OAS, diversas modificações foram desenvolvidas, entre elas a adição de moléculas de colesterol a extremidade do OAS.

A presença da molécula de colesterol na extremidade do oligonucleotídeo permitiu a ligação deste à LDE (Debes-Bravo, 2002). O complexo formado pelo oligonucleotídeos e a LDE, foi capaz de inibir em aproximadamente 75% a expressão do gene MDR1 em células de mieloma múltiplo, *in vitro*.

2.6 Resistência a múltiplas drogas

O uso de agentes quimioterápicos constitui um dos tratamentos eletivos para diversos tumores. Contudo, muitas neoplasias não respondem à quimioterapia e outras, inicialmente responsivas, tornam-se resistentes posteriormente. O desenvolvimento de resistência frente a diferentes agentes antineoplásicos é um obstáculo fundamental para o êxito terapêutico, desde o início do uso da quimioterapia no tratamento de tumores. A utilização de múltiplas drogas combinadas determinou um importante avanço para a

diminuição no desenvolvimento de resistência; porém, diversos tumores persistem resistentes aos mais diferentes tipos de tratamento farmacológico (Rezende *et al.*, 2005).

O fator de maior relevância envolvido no insucesso do tratamento do câncer, é portanto, representado pelo desenvolvimento de resistência à drogas pelas células tumorais (Liu *et al.*, 2001). A resistência à drogas pode ser definida como a habilidade das células neoplásicas de sobreviverem à exposição a agentes tóxicos em doses máximas toleradas por tecidos normais. A resistência a múltiplas drogas refere-se à resistência simultânea a uma variedade de agentes citotóxicos que apresentam diferentes sítios de ação e estruturas químicas diversas (Raaijmakers *et al.*, 1998).

Os mecanismos de resistência representam diversas formas de proteção da célula e do organismo e estão presentes na maioria das células normais. Infelizmente, muitos tumores utilizam esses mecanismos para sua própria proteção (Bergman, 2003).

Resistência a múltiplas drogas clássica é associada com proteínas transmembrânicas que mediam o efluxo de componentes citotóxicos, levando a diminuição celular da droga e de sua toxicidade. Várias bombas de efluxo de drogas relacionadas ao MDR já foram caracterizadas. A maioria delas pertencem à superfamília de transportadores ABC (Swerts *et al.*, 2006).

Já foram identificados 48 genes ABC humanos (Dean *et al.*, 2001). Existem sete subfamílias classificadas como transportadoras ABC (ABCA até ABCG), que são expressas tanto em células normais, como em malignas. Estão envolvidos no transporte de muitas substâncias, incluindo a excreção de toxinas do fígado, rins e trato gastrointestinal. Limitam também a penetração de toxinas

em estruturas vitais, tais como cérebro, placenta e testículos (Leonard *et al.*, 2003).

Uma variedade de mecanismos celulares pode levar ao aparecimento de resistência a múltiplas drogas (MDR), incluindo o aumento da expressão de transportadores celulares, redução da captação de drogas, alteração dos mecanismos de destoxificação, aumento do processo de reparação do DNA, regulação negativa dos alvos das drogas, alteração na regulação do ciclo celular e alterações nas vias apoptóticas (Borst, 1991; Krug, 2003).

Os mecanismos de ação do gene MDR identificados incluem: (1) ativação da via metabólica de destoxificação como consequência da ativação e/ou superexpressão de enzimas chaves, tais como glutathione S-transferase, citocromo P450; (2) redução do conteúdo de enzimas que são alvos dominantes para ação de drogas, como isoenzimas da DNA topoisomerase; (3) alteração em drogas que induzem apoptose através da alteração da expressão do gene envolvido na via Bcl-2; (4) redução do nível intracelular de concentração de droga, através de extrusão de droga por vários transportadores de membrana, tais como P-glicoproteína, proteína associada ao MDR (MRP) e outras (Breier *et al.*, 2005).

2.6.1 P-glicoproteína

O gene MDR1 que codifica a P-gp foi localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q21-31), em 1987 (Trent *et al.*, 1987). Contém 28 éxons,

interligados por íntrons que juntos contêm mais de 100Kb de DNA genômico. O RNA transcrito tem aproximadamente 4.5Kb (Raymond *et al.*,1989).

A proteína codificada pelo gene MDR1 (ABCB1), a P-gp, é uma glicoproteína de membrana com peso molecular de 170KDa (Juliano & Ling *et al.*,1976), que funciona como uma bomba orgânica catiônica (Gregory *et al.*, 2003). Consiste de duas partes aproximadamente iguais que são homólogas entre si. Ambas as partes contêm um domínio hidrofóbico e um hidrofílico. Cada domínio hidrofóbico inclui seis segmentos transmembrânicos (figura 2), onde o domínio hidrofílico compartilha a sequência homóloga de componentes da membrana periplasmática de bactérias, que incluem sítios de ligação de nucleotídeos (Chen *et al.*,1986).

Figura 2 - Estrutura da P-glicoproteína (Chen *et al.*, 1986)

O gene MDR foi inicialmente descrito em células de mamíferos em 1970 por Biedler e Reihn (1970), que observaram resistência cruzada a vários agentes citotóxicos, incluindo alcalóides da vinca, a antraciclina, e a daunorrubicina, em células de hamster Chinês, cuja resistência foi adquirida através do aumento de concentração de actinomicina D, no meio de crescimento celular. Dano (1973) e Skovsgaard (1978), em estudos subseqüentes demonstraram que a aquisição do fenótipo MDR em células de ascite de Ehrlich estava associado ao efluxo celular de droga, de forma dependente de energia. Simultaneamente, Juliano e Ling (1976) demonstraram que a aquisição de MDR em células de ovário de hamster chinês estava associada ao aparecimento de uma glicoproteína ligada à membrana celular que foi designada de P-gp.

Estes estudos iniciais (Dano, 1973; Juliano *et al.*, 1976), também demonstraram o papel da resistência a múltiplas drogas a diferentes substâncias hidrofóbicas, anfipáticas e drogas de produtos naturais, incluindo colchicina, doxorrubicina e vimblastina. A lista aumentou com o tempo, incluindo dezenas de drogas citotóxicas, agentes quimioterápicos como o taxol e topotecan e outras drogas citotóxicas como peptídeos hidrofóbicos tóxicos, incluindo gramicidina D e valiomicina. Muitos outros agentes que são relativamente atóxicos a células também interagem com a P-gp, como o verapamil e ciclosporina A (Gottesman *et al.*, 1995).

A P-gp é expressa em vários tecidos normais com função de secreção ou barreira. Está presente em células do córtex da glândula adrenal, na superfície

canalicular de hepatócitos, superfície apical das células dos túbulos contornados proximais do rim, superfície mucosa do intestino delgado e grosso, glândulas sebáceas da pele, endométrio do útero gravídico, trofoblastos da placenta, dutos pancreáticos e células epiteliais de tecidos como testículo e cérebro (Fojo *et al.*,1987;Thiebaut *et al.*,1987; Cordon-Cardo *et al.*,1989). P-gp também é expressa em precursores hematopoiéticos e linfócitos (Chaudhary *et al.*,1991; Chaudhary *et al.*, 1992). Sugere-se que a Pgp tem uma função na excreção e/ou transporte de substâncias xenóbicas citotóxicas.

A maioria dos agentes quimioterápicos é degradada na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática, difundindo-se em um gradiente de concentração. A P-gp atua contrariamente, expulsando esses agentes para o meio extracelular (Ambudkar *et al.*,2003). Existem, pelo menos, três mecanismos possíveis de ação: (a) substratos anfipáticos e lipofílicos são removidos do citoplasma através de um canal formado por segmentos transmembrânicos (Endicott *et al.*,1990; Higgins, 1992); (b) P-gp transporta compostos tanto de fora como de dentro da membrana lipídica para o meio externo (Gottesman *et al.*,1993; Bolhuis *et al.*,1997); (c) transporta drogas de dentro para fora da membrana lipídica, após o composto deixar a membrana plasmática por difusão (Higgins *et al.*,1992; Higgins, 1994).

O gene MDR é expresso normalmente de forma tecido específica (Thiebaut *et al.*, 1987). A expressão do gene MDR pode ser induzida de forma transitória devido a estímulos externos, tais como, carcinógenos, drogas quimioterápicas, arsenite e choque térmico (Chin *et al.*, 1990; Chaudhary *et al.*,1993). O MDR pode ser expresso de forma induzida ou fisiológica (Yu *et al.*,1995).

O aumento da expressão de P-gp vem sendo relatado com o aumento dos níveis de mRNA do MDR1, que pode estar ligado à amplificação gênica e/ou aumento de transcrição gênica (Fojo *et al.*,1985;Shen *et al.*,1896). A amplificação gênica pode manifestar-se através de estruturas intracromossomo no DNA, como HSRs (“homogeneously staining regions”), ABRs (“abnormal banding regions”). DNAs extracromossomais, são maiores que 1000Kb, aparecem freqüentemente como estruturas de cromatina pareada e circular e são denominadas DMs (“double minute chromosomes”) (Gottesman *et al.*,1995). Através de duas estratégias de clonagem utilizadas para isolar o gene MDR, foi possível demonstrar a presença de DNA amplificado (Roninson, 1984, 1987).

A P-gp está envolvida na esterificação do colesterol. O mecanismo utilizado, é provavelmente, através da redistribuição do colesterol na membrana plasmática, facilitando sua esterificação (Debry *et al.*,1997). O meio lipídico pode influenciar drasticamente as características da atividade ATPase da P-gp (Urbatsch & Senior, 1995). O aumento do acúmulo de colesterol na membrana de células resistentes tem conseqüências na atividade da P-gp. Por isso, a retirada de colesterol em células P-gp resistentes a vincristina induzem a modulação dos níveis de resistência a quimioterápicos (Pallares-Trujillo *et al.*,1993). Também foi demonstrado que elevadas concentrações de colesterol celular podem aumentar a atividade da P-gp em células mononucleares humanas (Troost *et al.*,2004).

2.7. Terapia gênica utilizando MDR1 como alvo

Três estratégias foram desenvolvidas para diminuir a expressão de P-gp em células MDR: (1) componentes químicos, como verapamil, ciclosporina –A e MS-209; (2) anticorpos monoclonais, como MRK16 ou imunotoxinas contra P-gp e (3) oligonucleotídeos antissenso para a inibição específica da expressão do gene da P-gp (Motumura *et. al.*, 1998).

A modulação do MDR por OAS é extremamente difícil. A superexpressão do mensageiro da P-glicoproteína e de sua proteína em células resistentes, representam dificuldades para a tecnologia antissenso (Alahari, *et al.*, 1996). Foi demonstrado por Alahari *et al.* (1996) que OAS quando conjugados com colesterol, inibiam a expressão da mensagem do MDR1 e da P-gp, porém a inibição não ultrapassou 60%.

Inibir a expressão do gene MDR através de procedimentos moleculares, como a utilização de oligonucleotídeos, é de grande interesse. Por outro lado, a inibição indiscriminada poderia levar a reações adversas, pois este gene também exerce importantes funções fisiológicas. Este fato faz com que o desenvolvimento de vetores para o transporte direcionado de oligonucleotídeos a células-alvo específicas seja de grande importância.

3. Objetivos

- Estudar a utilização da LDE como vetor de oligonucleotídeos antissenso;
- Estudar características de ligação do oligonucleotídeos antissenso à LDE;
- Estudar a ligação e sua interiorização celular do complexo LDE/oligonucleotídeo antissenso ao receptor de LDL;
- Estudar a efetiva ação do oligonucleotídeo antissenso transportado pela LDE na expressão do gene MDR.

4. Métodos

4.1 Preparo de lipoproteínas humanas (HDL e LDL), soro deficiente de lipoproteínas (SDL) e nanoemulsão lipídica (LDE)

4.1.1 Preparo de LDL e HDL plasmáticas humanas

A preparação de LDL e HDL nativa foi feita a partir de plasma humano, obtido de doadores de sangue, após fracionamento do sangue de acordo com o método de Havel (1955). Adicionou-se ao plasma benzamidina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nas concentrações finais de 2 mM, 1 mM e 1 mg/ml, respectivamente. A densidade do plasma foi ajustada inicialmente de 1,006 g/ml (densidade normal do plasma) para 1,063 g/ml com brometo de potássio (KBr), na quantidade calculada de acordo com a fórmula de Radding-Steinberg (1960). Após homogeneização, as amostras foram ultracentrifugadas em ultracentrífuga Beckman a 49.000 x g por 24 horas a 4°C em rotor 80Ti. Após ultracentrifugação, o material de cor alaranjada (LDL) contido na porção superior do tubo (densidade inferior a 1,063 g/ml), foi aspirado; desprezou-se a porção incolor intermediária, e a porção esverdeada presente no fundo do tubo foi também aspirada. A densidade do material que contém a LDL foi determinada e ajustada para 1,006 g/ml com solução salina. Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A fração de densidade superior a 1,006 g/ml foi coletada e dialisada extensivamente contra tampão de 150mM de cloreto de sódio (NaCl) por 48 a 72 hs. A densidade do material que contém a HDL foi ajustada para 1,215g/ml com KBr.

Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A porção amarela correspondente a HDL foi coletada e dialisada contra tampão de 150mM de cloreto de sódio (NaCl) por 72 hs. A concentração de proteína, tanto da LDL como da HDL purificadas, foi determinada pelo método de Lowry (1951). O material foi esterilizado por passagem em filtro de 0,22 µm e armazenado a 4°C sob atmosfera de nitrogênio até o momento de sua utilização (HAVEL *et al.*, 1955).

4.1.2 Preparo de soro deficiente de lipoproteína (SDL)

Plasma total colhido com EDTA como anticoagulante teve a densidade inicial de 1,006 g/ml ajustada para uma densidade final de 1,215 g/ml com KBr, de acordo com a fórmula de Radding-Steinberg (1960). Centrifugou-se 60.000 rpm por 36 horas a 4°C em rotor 80Ti. Após ultracentrifugação, duas fases foram observadas: a porção superior, correspondente às lipoproteínas, e a porção inferior, correspondente ao plasma deficiente em lipoproteínas. Coletou-se cuidadosamente a porção inferior e dialisou-se extensivamente contra cerca de 20 litros de 150 mM NaCl por 72 horas. Após a diálise, o plasma deficiente de lipoproteína foi convertido em soro deficiente de lipoproteína pela adição de trombina [10 US (NIH) unidades/ml] e incubado a 4°C por 24 horas. O coágulo resultante foi removido por centrifugação a 18.000 rpm por duas horas a 4°C. O soro foi esterilizado por filtração em filtros de 0,45 µm (Millex-HA). Mediu-se a concentração de proteína pelo método de Lowry (1951), e ajustou-se para 50

mg/ml com 150 mM NaCl estéril. O SDL foi aliquotado esterilmente e mantido congelado a -70°C até o momento de sua utilização (GOLDSTEIN *et al.*, 1983).

4.1.3 Eletroforese de lipoproteínas

A eletroforese de lipoproteínas foi realizada em fitas de acetato de celulose (STEIN,1986). Utilizou-se como reagentes: tampão Tris-Veronal, pH $9,1 \pm 0,2$; tampão High Buffer pH $8,8 \pm 0,2$; NaOH 5,5%; etanol absoluto; corante Sudan black. Como soluções de trabalho: solução de coloração (50 mL de Sudan black + 50 mL de NaOH 5,5%) e solução fixadora (30 mL de NaOH 5,5% + 20 mL de etanol absoluto).

A fita de acetato de celulose foi umedecida com tampão Tris-Veronal; o excesso de tampão foi removido com papel-filtro. Amostras de plasma, HDL, LDL e SDL, obtidas conforme descrito acima, foram aplicadas nas fitas por três vezes, esperando-se a absorção das amostras entre uma aplicação e outra. Colocou-se o tampão Tris-Veronal na cuba de eletroforese. As fitas foram colocadas em uma base de apoio e, em seguida, na cuba de eletroforese com a parte da aplicação do lado do polo negativo. A voltagem aplicada foi de 200 volts e o tempo de corrida foi de 45 minutos. Após a corrida eletroforética, as fitas foram retiradas e colocadas na solução fixadora por 10 minutos e, em seguida, na solução de coloração até o dia seguinte, quando foram retiradas, lavadas em água corrente e mantidas em um recipiente com água destilada até a análise.

4.1.4 Preparo de LDE marcada com [^3H]

Foi preparada uma mistura contendo 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína, 0,5 mg de colesterol livre não esterificado e 65 μCi de [^3H] colesteriloleil éter (atividade específica, 30-60 Ci/mmol). Os lipídeos encontravam-se dissolvidos em solvente que foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e incubado por 14-16 horas em dissecador a 4°C para a completa eliminação do solvente. Os lipídeos foram então ressuspensos em 10 ml de tampão (10 mM Tris.HCl, pH 8.0 e 100 mM KCl), e sonicados continuamente por 180 minutos sob fluxo de nitrogênio e temperatura abaixo de 52°C. A suspensão de lipídeos emulsificada foi então separada por ultracentrifugação, como descrito anteriormente para o preparo de LDL plasmática humana. A LDE purificada pela ultracentrifugação foi dialisada contra tampão PBS por 24 hs para eliminação do KBr, esterilizada por passagem em filtro com diâmetro de poro de 0,22 μm (MARANHÃO *et al.*, 1993) e armazenada do mesmo modo que descrito para LDL e HDL, até o momento de sua utilização.

4.2 Estudo da capacidade de ligação entre oligonucleotídeo antissenso e emulsão lipídica (LDE) por fluorescência

O seguinte oligonucleotídeo antissenso foi utilizado, com ligação fosforotioato substituindo as fosfodiéster:

SCR-AS1 FITC-5' TCg CCC TCg CCC TCg ACC CA 3'-Colesteril
("Scrambled")

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Estrutural, Faculdade de Química da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Profa. Dra. Shirley Shreier. Utilizou-se um fluorímetro Hitachi F4500 (Tokyo, Japão), à temperatura ambiente (21°C). O oligonucleotídeo antissenso foi excitado a 488nm e o espectro de emissão foi coletado entre 490 a 680nm (SCHREIER, 2003). Foi utilizada a concentração constante de 0,4µM de oligonucleotídeo. Foi realizada uma titulação da emulsão lipídica (LDE), de 0,2 a 1,4µM.

4.3 Análise do tamanho de emulsão lipídica (LDE)

O tamanho das diferentes emulsões foi estimado por laser light scattering (Zeta Pals, EUA). O laser de estado sólido de 15mW, com coeficiente de difusão de 10^{-6} a 10^{-9} cm²/seg, e ângulo fixo de 90° é capaz de medir a variação de tamanho de 2nm até 3µm. Diluiu-se as emulsões com solução salina 0.9%, seguido de filtração em filtro de poro 0,22µm, com posterior análise por light scattering (OWENS *et al.*, 2001).

4.4 Estudos dos receptores de LDL

4.4.1 Cultura de células de sarcoma uterino sensível e resistente a quimioterápicos

Células de sarcoma uterino humano MES-SA e MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1976 e 1977), sensíveis e resistentes à doxorrubicina, foram cultivadas em meio McCoy's 5A contendo SFB 10%, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 26,4 mM bicarbonato de sódio (HAKER *et al.*, 1983; HAKER & SIHIC, 1985). Estas células cresceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, até o momento de sua utilização em experiências específicas.

4.4.2 Extração de RNA total

Células de sarcoma uterino sensíveis e resistentes foram contadas e coletadas por centrifugação a 1.850 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de TRIzol para cerca de $5-10 \times 10^6$ células e homogeneizou-se bem com uma pipeta. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo previamente esterilizado. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% em água

tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizou-se em vortex, suavemente, por 15 segundos. Centrifugou-se a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar ao ar por 15 minutos à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µl de água tratada com DEPC (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987).

4.4.3 Análise de receptores de LDL por RT-PCR

Células de sarcoma uterino sensíveis e resistentes à doxorubicina foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços, por 24, 48 e 72 horas em meio contendo soro deficiente de lipoproteínas e sem atingirem confluência. RNA total foi extraído, utilizando-se 2×10^6 células.

Na reação de RT-PCR, os “primers” utilizados foram:

LDLR-S 5'-TgC CAA gAC ggg AAA TgC ATC TCC T -3'

LDLR-AS 5'-gCT ACT gTC CCC TTg gAA CAC gTA A -3'

As misturas de reação de RT-PCR foram montadas utilizando kit comercial Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA (utilizando os mesmos “primers” ou iniciadores descritos para a reação de amplificação) incubou-se a mistura de reação por 30 minutos a 50°C, seguida por um ciclo de desnaturação por 30 segundos a 92°C; anelamento por 30 segundos a 55°C e

extensão por 1 minuto a 72°C por 30 ciclos. Para a extensão final, as amostras foram incubadas a 72°C por 8 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 2%, em TAE e foram corados com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV (NAKAZATO *et al.*, 2001).

4.5 Ligação, Inteorização e distribuição complexo oligonucleotídeo antissenso/ LDE.

4.5.1 Ensaio de ligação de superfície e internalização de [³H]LDE em células de sarcoma uterino resistente à doxorrubicina

1 x 10⁴ células foram semeadas em placa de 48 poços, utilizando-se 0,5 ml de meio de cultura com SFB 10% e incubadas por 72 horas. Trocou-se o meio, para meio de cultura com 10% SDL, e continuou-se a incubação por mais 48 horas.

Para o experimento de ligação ao receptor de LDL, as células foram incubadas a 4° C por 30 minutos. O meio de cultura foi trocado por 0,5 ml de meio gelado contendo diferentes concentrações de [³H]LDE (0,01% a 1%), pré-incubado com 47µg/ml de HDL, na presença ou não de LDL na concentração de 75µg/ml. Incubou-se por 1 hora a 4° C. O meio de cultura foi coletado para análise de radioatividade da LDE (contador de cintilação líquida – LKB Wallac). As células foram lavadas por três vezes com 0,5 ml de tampão de lavagem gelado (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl, pH 7,4 e 2mg/ml de soroalbumina

bovina). Incubou-se duas vezes com tampão de lavagem gelado por 10 minutos. As células foram lavadas rapidamente com tampão contendo 150mM NaCl, 50mM Tris/HCl (pH 7,4). Adicionou-se 0,5 ml de tampão contendo 50mM NaCl, 10mM HEPES, 4mg/ml de dextran sulfato gelado (para liberar as partículas de LDL e LDE ligadas ao receptor de LDL) e colocou-se em agitador rotatório por 60 minutos a 4°C. O tampão foi coletado e contou-se a quantidade de radioatividade da LDE, liberada para o tampão. As células foram lisadas com 0,5 ml de 0,1N NaOH à temperatura ambiente por 15 minutos (GOLDENSTEIN *et al.*, 1983). Do lisado de células 50µl foram utilizados para determinação de radiação correspondente a LDE e 100µl utilizados para a determinação do conteúdo de proteína celular pelo método de Bradford (1976).

Para medir a ligação e captação de [³H]LDE o ensaio foi bastante semelhante ao descrito acima, na análise da ligação ao receptor. As diferenças foram basicamente os meios de cultura que estavam aquecidos a 37°C, e não gelados. As células foram incubadas por 2 horas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram, então, transferidas a 4°C, lavadas e incubadas conforme experimento a 4° C (GOLDSTEIN, *et al.*, 1983).

4.5.2 Interiorização do complexo oligo/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes

3 x 10⁵ células foram semeadas em 3 ml de meio de cultura com 10% SFB em placas de 6 poços (35 mm de diâmetro cada). Incubou-se por 24 horas.

As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e adicionou-se, então, 3 ml de diferentes incubações do oligo e do complexo OAS/LDE. A concentração de oligo utilizada foi de $0,4\mu\text{M}$. Incubou-se OAS com meio contendo 10% SFB ou 10% de SDL, na presença ou ausência de HDL, por 24 horas. Previamente a leitura as células foram lavadas 3 vezes com PBS e mantidas em 3 ml de PBS. A interiorização do complexo OAS/LDE ou oligonucleotídeo isolado foi verificada através de microscopia de fluorescência (ALAHARI *et al.*, 1992).

4.5.3 Distribuição do complexo oligo/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP - Escola Paulista de Medicina com a colaboração do Prof. Dr. Renato A. Mortara.

1×10^6 células foram incubadas, em lamínulas redondas, por 24 horas em meio contendo 10% de SFB. Posteriormente, foi realizada incubação, por 24 horas, com meio contendo 10% de SDL. As células foram incubadas com $0,4\mu\text{M}$ de OAS na presença de $0,7\mu\text{M}$ de LDE e $47\mu\text{g/ml}$ de HDL por 3 dias consecutivos⁸. As células foram fixadas em solução de formol a 3,5% em PBS, por 1 hora e 30 minutos. Foi realizada uma lavagem rápida com PBS e foi feita incubação por 15 minutos com cloreto de amônio (50mM). Foi realizada outra lavagem rápida com PBS e posterior incubação com gelatina (0,25%), azida

sódica (0,1%) e saponina (0,1%), por pelo menos 2 horas. Foi realizada outra lavagem com PBS e foi realizado incubação com DAPI (1M) por 10 minutos; a lamínula foi lavada novamente com PBS e colocada sobre uma lamina utilizando-se glicerol e selada com esmalte. Diariamente foi feita análise em microscópio confocal. As imagens foram analisadas pelo programa WCIF ImageJ.

4.6 Teste de citotoxicidade das lipoproteínas, da LDE pré incubada com HDL e dos oligonucleotídeos

1×10^4 células (tanto as resistentes como as sensíveis) foram cultivadas em meio de cultura em placas de 24 poços, em triplicata. As células foram incubadas sem ou com diferentes concentrações de LDL, HDL, LDE pré-incubada com HDL e os diferentes oligonucleotídeos, por 3 dias consecutivos. Diariamente foi feita análise de viabilidade celular pelo método de MTT (CARMICHAEL, 1987).

4.7 Análise semi-quantitativa da expressão de P-glicoproteína por RT-PCR

Na reação de RT-PCR, os “primers” utilizados foram:

β_2 MG-S 5'- ACC CCC ACT gAA AAA gAT gA -3' (Controle Interno)

β_2 MG-AS 5'- ATC TTC AAA CCT CCA TgA Tg -3' (Controle Interno)

MDR1-S 5'- CCC ATC ATT gCA ATA gCA gg -3'

MDR1-AS 5'- gTT CAA ACT TCT gCT CCT gA -3'

As misturas de reação de RT-PCR foram montadas utilizando kit comercial Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA (utilizando os mesmos “primers” ou iniciadores descritos para a reação de amplificação) incubou-se a mistura de reação por 30 minutos a 50°C, seguida por um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos. A amplificação de quantidades iguais de RNA total de células estudadas foi realizada nas seguintes condições: desnaturação por 30 segundos a 94°C; anelamento por 30 segundos a 55°C e extensão por 1 minuto a 72°C por 22 ciclos. Para a extensão final, as amostras foram incubadas a 72°C por 8 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução 2% em TAE corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV (LEE *et al.*, 1997; NOONAM *et al.*, 1990).

A quantificação de produto de RT-PCR na fase logarítmica de amplificação foi feita através de uma curva onde o RNA total de células sensíveis (que não expressam o gene MDR1) foi misturado ao RNA de células resistentes (que expressam o gene MDR1) em concentrações conhecidas, e normalizadas de acordo com a banda 28S do RNA total, por densitometria (Personal Densitometer – Molecular Dynamics). Tendo-se a curva-padrão a partir de concentrações conhecidas, determinou-se a concentração de mRNA para MDR1 (LEE *et al.*, 1996).

4.8 Verificação da sensibilidade das células tratadas em concentrações crescentes de doxorrubicina.

1 x 10⁴ células de sarcoma uterino resistente foram cultivadas em meio de cultura em placas de 96 poços, em triplicata. As células foram incubadas sem ou com incubação prévia de OAS na presença de 0,7µM de LDE e 75µg/ml de HDL. Foram utilizadas diferentes concentrações de doxorrubicina por 24 horas (HAKER & SIKIC, 1985). Foi feita análise de viabilidade pelo método de MTT (CARMICHAEL, 1987).

5. Resultados

5.1 Análise de lipoproteínas no plasma, nas frações lipoprotéicas e no soro deficiente de lipoproteínas

As amostras de LDL, HDL e soro deficiente de lipoproteínas (SDL) foram extraídas por ultracentrifugação a partir de plasma. Estas frações foram utilizadas para os estudos de atividade do receptor de LDL. Foi possível observar, através da eletroforese de lipoproteínas (figura 3), que as amostras estavam puras e não havia contaminação da amostra com outra lipoproteína. No plasma observa-se a presença das duas bandas de interesse, a superior sendo a β -lipoproteína (correspondente a LDL) e a inferior a α -lipoproteína (correspondente a HDL). Nas extrações realizadas observou-se a banda correspondente ao produto extraído; na fração SDL não se observou a presença de nenhuma lipoproteína.

Figura 3 - Eletroforese de lipoproteínas em acetato de celulose.
1: Plasma; 2: HDL; 3: LDL; 4: Soro Deficiente de Lipoproteínas (SDL)

Foi realizada a determinação de colesterol total e frações das amostras obtidas. A tabela 1 mostra os resultados da determinação de colesterol e de triacilgliceróis em duas amostras de plasma utilizadas e frações correspondentes. Como esperado, as amostras de LDL apresentaram uma concentração maior de colesterol e de triacilgliceróis do que a HDL e SDL.

Tabela 1 - Concentração de colesterol e triacilgliceróis em plasma, LDL, HDL e SDL

Plasma e frações	Colesterol (mg/dl)		Triacilgliceróis (mg/dl)	
	1º extração	2º extração	1º extração	2º extração
Plasma	107,00	127,00	47,00	76,00
LDL	244,00	1313,0	35,00	120,00
HDL	40,00	48,00	31,00	15,00
SDL	----	3,00	----	5,00

Foi realizada dosagem de proteína das amostras fracionadas. A tabela 2 mostra os valores das proteínas. Observa-se que a concentração de proteínas na HDL é acima de 10 vezes maior do que na LDL, o que seria de se esperar, visto que a maior parte da composição da HDL é de proteínas (cerca de 50%), enquanto que a LDL contém somente 25% de proteínas. A concentração de

proteínas de LDL (mg/ml) nas duas preparações foi, respectivamente, 1,06 e 1,14. Assim as frações obtidas foram colocadas em um pool.

Tabela 2 - Concentração de proteínas totais nas preparações de LDL, HDL e SDL

Lipoproteínas	Proteínas totais (mg/ml de preparação)	
	1º extração	2º extração
LDL	2,30	11,5
HDL	156,85	128,6
SDL	---	59,0

5.2 Capacidade de ligação aproximada entre oligonucleotídeo antissenso (OAS) e emulsão lipídica (LDE)

O OAS apresenta na extremidade 5' uma molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC), e na extremidade 3' um colesterol; desta forma, é possível ocorrer a ligação entre o colesterol do OAS e a LDE. A presença do FITC permite a utilização de fluorímetro para detectar a ligação do OAS a LDE.

Como comprimento de onda de excitação, utilizou-se 488nm (SCHAUENSTEIN *et al.*; 1978). Os parâmetros de leitura foram: voltagem de leitura 700V; Split (ex/em) de 5nm/5nm; velocidade de leitura de 60nm/min e 2 leituras por amostra.

Utilizou-se 0,4 μ M de OAS e titulou-se a LDE até se encontrar o ponto de saturação (figura 4). Obtiveram-se diferentes espectros de emissão; conforme aumentava a concentração de LDE, mais fluorescência era emitida, até chegar ao ponto em que não ocorria mais aumento da fluorescência.

A LDE é uma emulsão lipídica que diluída em água pode levar a espalhamento de luz, o que interfere na leitura final da fluorescência. Desta forma, foi realizada leitura somente da LDE nas mesmas concentrações utilizadas nas leituras do OAS/LDE. Foi demonstrado que ocorre um pequeno espalhamento de luz (figura 5). Este espalhamento ocorre em menor quantidade em menores concentrações de LDE e, conforme ocorre o aumento da concentração, também aumenta o espalhamento de luz.

Figura 4 - Espectro de emissão de OAS complexado a diferentes concentrações de LDE

Figura 5 - Espectro de emissão de diferentes concentrações de LDE

Tendo-se o espectro da LDE e do complexo OAS/LDE, foi realizada a subtração dos espectros do complexo OAS/LDE com o respectivo espectro de LDE, com intuito de evitar que o espalhamento de luz que a LDE promove, causasse erro nas análises destes dados.

Calculou-se a concentração de fosfatidilcolina (PC) existente em cada titulação, sendo os dados expressos em função da concentração de PC da LDE.

A figura 6 relaciona a concentração de PC com o valor máximo de fluorescência de cada espectro, sem a interferência do espalhamento de luz da LDE. Observa-se que, utilizando $0,4\mu\text{M}$ do OAS, ocorre a saturação com $0,7\mu\text{M}$ de PC.

A figura 7 mostra a divisão de F (valor máximo de fluorescência das diferentes titulações de OAS/LDE) por F_0 (valor máximo de fluorescência do OAS sem a presença de LDE). Observa-se na figura 6 que houve aumento de 13 vezes do valor inicial de fluorescência. O aumento da fluorescência pelo acréscimo de LDE ocorre até a concentração de $0,7\mu\text{M}$ de PC, seu ponto de saturação.

Para determinar a constante de ligação (K_b), os resultados foram analisados de forma análoga à cinética enzimática michaeliana. A K_b é calculada utilizando-se a média entre o valor médio de fluorescência na saturação do OAS/LDE e o valor de fluorescência do OAS sozinho. O valor de fluorescência obtido é, então, projetado no eixo X. Desta forma, é obtido um valor de concentração de PC. A constante é obtida dividindo-se 1 pelo valor obtido de PC. Desta forma, o K_b para o OAS/LDE é $4,2 \times 10^{-3}\text{M}^{-1}$.

Figura 6 - Concentração de fosfatidilcolina da LDE com o valor máximo de fluorescência de cada espectro sem a interferência do espalhamento de luz da LDE

Figura 7 - Divisão de F (valor máximo de fluorescência das diferentes titulações de OAS/LDE) por F_0 (valor máximo de fluorescência do OAS sem a presença de LDE)

5.3 Estimativa do tamanho da LDE

O diâmetro médio e a polidispersidade de três diferentes LDE foram estimados por *laser light scattering*, e os resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Diâmetro médio e polidispersidade da LDE

	Diâmetro (nm)	Polidispersidade
LDE 1	$39,0 \pm 0,3$	$0,168 \pm 0,007$
LDE 2	$33,4 \pm 0,2$	$0,164 \pm 0,006$
LDE 3	$38,6 \pm 0,4$	$0,208 \pm 0,005$

A emulsão lipídica apresenta diâmetro médio de 37 nm com pequena variação entre diferentes preparações. A LDE apresenta um perfil polidisperso, isto é, a população de LDE não é homogênea. A figura 7 demonstra a distribuição multimodal da LDE com a presença da emulsão de diferentes tamanhos.

A presença do oligonucleotídeo antissenso na emulsão lipídica não alterou o diâmetro e a polidispersidade da LDE.

Figura 8 - Distribuição multimodal de LDE

5.4 Análise do receptor de LDL por RT-PCR

As células foram incubadas conforme descrito. A concentração de mRNA foi determinada através da normalização das células resistentes, de acordo com a banda 28S do RNA total.

Foi montada uma curva de acordo com os diferentes dias de carenciamento de lipoproteínas. A figura 9 mostra o gel de agarose a 2%, do produto de amplificação do gene de LDLr da célula de sarcoma uterino resistente e a figura 10 o padrão densitométrico das bandas.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR da curva de LDLr de sarcoma uterino resistente. β_2 MG: β_2 -microglobulina, PM: padrão de peso molecular, 1: 0hs, 2: 24hs, 3: 48hs, 4: 72hs de carenciamento (N=3)

O gel de agarose mostra a banda de 486pb que representa o produto de amplificação do gene de LDLr por RT-PCR. A curva de expressão do gene de LDLr foi derivada da densitometria das bandas do produto de RT-PCR do LDLr em relação a do produto da β 2-microglobulina. Observa-se o aumento da expressão de LDLr conforme aumenta o tempo de careciamento de lipoproteínas, sendo este aumento dependente de tempo.

Figura 10 - Análise densitométrica da banda que corresponde ao produto de amplificação do gene LDLr em relação a do produto de β 2-microglobulina (N=3)

5.5 Ligação, Inteorização e distribuição do complexo oligonucleotídeo antissenso/ LDE

5.5.1 Ensaio de ligação de superfície e internalização de [³H]LDE em células de sarcoma uterino resistente a doxorrubicina

Os experimentos foram realizados com seis diferentes concentrações de [³H]LDE variando de 0,01% a 1%. Procurava-se a melhor concentração em que a quantidade de [³H]LDE fornecida fosse o suficiente para saturar os receptores de LDL sem que houvesse traços de radioatividade no meio de incubação. A concentração ótima encontrada foi 0,25% de [³H]LDE. Foi utilizado 47µg/ml de HDL, pois esta fornece apo E para a [³H]LDE que, então, adquiri a capacidade de se ligar ao receptor B/E (Debes-Bravo, 2002). A utilização de polímeros como dextran sulfato libera as lipoproteínas que estão ligadas a membrana plasmática, desta forma é possível analisar a quantidade de radioatividade que permaneceu na membrana .

[³H]LDE tem ligação de alta afinidade por células em cultura na presença de soro deficiente de lipoproteína. Nos experimentos realizados encontrou-se 89,66±25,45% da radioatividade ao receptor; 9,8±7,07% permaneceu ligado à membrana plasmática e somente 0,54±2,83%% foi internalizado.

A ligação da [³H]LDE ao receptor é inibida de forma competitiva por lipoproteína plasmáticas que contém apo B (LDL), sendo que HDL não compete por este receptor. Desta forma, a incubação prévia com HDL não interfere no ensaio.

O acréscimo de LDL leva à competição pelo receptor de LDL; desta forma, espera-se que a quantidade de [^3H]LDE ligado ao receptor diminua. Obteve-se aumento da radioatividade no sobrenadante recolhido ($33,85 \pm 12,02\%$) e o ligado à membrana plasmática diminuiu de 89,66% para $64,15 \pm 31,08\%$. Houve a internalização de $2,00 \pm 2,82\%$ de radioatividade.

A 37°C ocorre a internalização e degradação tanto da LDL como da [^3H]LDE. Desta forma, espera-se que a concentração de radioatividade seja menor do que a encontrada nos experimentos realizados a 4°C .

Nos experimentos realizados encontrou-se $12,92 \pm 6,02\%$ de radioatividade ligada à membrana plasmática, $11,53 \pm 0,99\%$ permaneceu no meio de incubação e $75,54 \pm 10,44\%$ foi internalizado.

Quando o experimento foi realizado na presença de LDL, obteve-se aumento da concentração de radioatividade no sobrenadante recolhido ($13,14 \pm 7,74$) e na membrana plasmática ($18,65 \pm 4,49\%$) e diminuiu a quantidade de radioatividade encontrada dentro das células ($68,20 \pm 9,87\%$). A figura 11 resume os resultados obtidos.

Figura 11 - Ligação e Internalização da [3 H]LDE pelo receptor de LDL

5.5.2 Interiorização do complexo OAS/LDE nas células de sarcoma uterino resistentes

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas em meio contendo SFB e/ou LPDS com 0,4 μ M de oligonucleotídeo AS2, na presença ou não de LDE e/ou HDL. A figura 12 mostra as células incubadas com o oligonucleotídeo. As células se encontravam subconfluentes. Observa-se, incubando as células com soro fetal bovino, a presença de fluorescência, esta presente em praticamente em todas as células (figura 12 A).

As células foram incubadas com oligonucleotídeos na presença de LPDS. Observa-se uma fluorescência mínima nas células (figura 12 B). A figura 12 C mostra a incubação do complexo OAS/LDE na presença de LPDS. Tem-se a presença de intensa fluorescência em todas as células.

A figura 12 D mostra a incubação do complexo OAS/LDE com LDE pré-incubado com HDL, na presença de LPDS.

Figura 12 - Análise de internalização do oligonucleotídeo através de microscopia de fluorescência. As células se encontram subconfluentes. **A:** Células incubadas com OAS em meio com SFB; **B:** Células incubadas com OAS em meio com LPDS; **C:** Complexo OAS/LDE em meio com LPDS e **D:** Complexo OAS LDE preincubado com HDL em meio com LPDS

5.5.3 Análise da distribuição do oligonucleotídeo antissenso em células de sarcoma uterino resistentes por microscopia confocal

A internalização do OAS conjugado com a LDE e pré-incubado com HDL foi analisada através da distribuição intracelular do oligonucleotídeo fluorescente utilizando microscopia confocal. Utilizou-se o oligonucleotídeo scramble. As células foram fotografadas simultaneamente para o oligonucleotídeo (FITC) e para o núcleo (DAPI). As imagens obtidas no microscópio confocal foram processadas através de programa de linguagem JAVA.

As células foram incubadas por 24 e 48 horas, sendo analisadas após estes períodos de tempo. Após 24 horas de incubação apresentaram distribuição homogênea de FITC, com distribuição da fluorescência por todo o citoplasma; houve pequena distribuição nuclear (figura 13A).

Após 48 horas de incubação com o oligonucleotídeo as células de sarcoma uterino resistentes tinham distribuição heterogênea da fluorescência (figura 13B). Não apresentaram distribuição nuclear de OAS. No citoplasma houve maior concentração na área próxima à membrana plasmática e apresentaram corpúsculos com alta concentração de fluorescência fora da célula.

Figura 13 - Imagens obtidas pelo microscópio confocal, após incubação com complexo OAS/LDE em células de sarcoma uterino resistente. **A:** Imagem da sobreposição da fluorescência do OAS com a fluorescência do núcleo após 24 horas de incubação. **B:** Imagem das células em contraste de fase após 24 horas de incubação. **C:** Imagem da sobreposição da fluorescência do OAS com a fluorescência do núcleo após 48 horas de incubação. **D:** Imagem das células em contraste de fase após 48 horas de incubação

5.6 Análise da citotoxicidade das lipoproteínas e do oligonucleotídeo antissenso

5.6.1 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

As células de sarcoma uterino sensíveis e resistentes foram incubadas com diferentes concentrações de LDL, por 3 dias consecutivos, tendo como controle células de sarcoma uterino em meio com SFB 10%. Foram realizadas verificação da viabilidade destas células nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados das células de sarcoma uterino resistentes encontram-se na figura 14. Observou-se um aumento na toxicidade da LDL, ficando, a viabilidade, inferior a 40% após 48 horas de incubação com as concentrações de 0,85 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 14 - Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de LDL em células de sarcoma uterino resistentes (N=3)

5.6.2 LDE pré-incubada com HDL

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas com diferentes concentrações de LDE pré-incubado com HDL em concentração constante ($0,75\mu\text{g/ml}$), por 3 dias consecutivos, tendo como controle células de sarcoma uterino em meio com SFB 10%. Foi realizada verificação da viabilidade destas células nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados das células de sarcoma uterino resistentes estão na figura 15

Figura 15 - Citotoxicidade de LDE pré-incubada com HDL em células de sarcoma uterino resistente (N=3)

A LDE não apresentou toxicidade para as células em incubações com concentração inferior a 1%. Acima desta concentração apresentou citotoxicidade máxima de 20%.

5.6.3 Análise da citotoxicidade dos oligonucleotídeos

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas com duas seqüências de oligonucleotídeos antissenso (AS1 e AS2) em diferentes concentrações, por até 72 horas, tendo como controle células de sarcoma uterino em meio com SFB 10%. A viabilidade destas células foi observada nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados estão na figura 16.

Figura 16 - Citotoxicidade de OAS em células de sarcoma uterino resistente. **A:** AS1; **B:** AS2 (N=3)

O oligonucleotídeo AS1 possui seqüência de nucleotídeos complementar ao códon AUG do gene MDR1. As células de sarcoma uterino resistentes quando incubadas com AS1 apresentaram, após 72 horas de incubação, viabilidade acima de 86%. A concentração de 0,1 μ M foi a única que apresentou padrão de citotoxicidade diferente. Em 48 horas a viabilidade era superior a 97%, enquanto as outras concentrações apresentavam aproximadamente 90% (figura 14 A). Quando incubadas com AS2 (também apresentam seqüência de

nucleotídeos complementar ao códon AUG do gene MDR1), as células apresentaram em 24, 48 e 72 horas viabilidade celular superior a 90%, com exceção de concentração de 0,2 μ M que, em 48 horas apresentou aproximadamente 80% de viabilidade, sendo esta elevada para acima de 98% em 72 horas (figura 16 B).

5.7 Expressão do gene MDR1 analisada por RT-PCR semi-quantitativo

5.7.1 Semi-quantificação da expressão do gene MDR1

Células de sarcoma uterino sensíveis e resistentes à doxorrubicina, tiveram o RNA total extraído pela técnica de TRIzol, utilizando-se 5×10^6 células. A concentração do mRNA para MDR1 de células foi determinada através de uma curva, onde RNA total de células sensíveis (que não expressam o gene MDR1) foi misturado ao RNA de células resistentes (que expressam o gene MDR1) em concentrações conhecidas, e normalizados de acordo com a banda 28S do RNA total (Figuras 17 e 18), por densitometria e expresso em unidades densitométricas.

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs totais das células de sarcoma uterino, em cultura S: sensível, R: resistente, PM: padrão de peso molecular (λ DNA cortado pela enzima hind III)

Figura 18 - Análise densitométrica da banda 28S (N=2)

De acordo com os valores densitométricos obtidos para a banda 28S de RNA total de células sensíveis e resistentes, foram feitas misturas destes RNAs de maneira que o tubo que continha apenas RNA de células sensíveis representava 0% de expressão do gene MDR1 enquanto que o tubo que continha somente RNA de células resistentes 100% de expressão deste gene.

Foram montadas reações de RT-PCR a partir de 2 μ l de cada uma das misturas e o produto de amplificação (figura 19) foi quantificado por densitometria para a construção de uma curva de expressão do gene MDR-1 (figura 20).

A figura 19 mostra um gel típico de eletroforese de produtos de RT-PCR em agarose, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador

de ultravioleta. Verifica-se que, aumentando a concentração de RNA total isolado a partir de células de sarcoma uterino resistentes, ocorre um aumento da banda que corresponde ao produto de RT-PCR do gene MDR1, conforme foi confirmado por análise densitométrica.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR da curva de quantificação da expressão do gene MDR1. **PM**: padrão de peso molecular, **1**: 0%, **2**: 25%, **3**: 50%, **4**: 75% e **5**: 100% de expressão (N=3)

A curva de expressão do gene de MDR1 (figura 19) foi derivada da densitometria das bandas do produto de RT-PCR do MDR1 em relação à do produto de β_2 -microglobulina; assim, evitou-se possível interferência da quantidade de amostra aplicada no gel de agarose na expressão do gene MDR1. Os resultados mostraram que a relação manteve-se constante.

Figura 20 - Análise densitométrica da banda que corresponde ao produto de amplificação do gene MDR1 em relação à do produto de β_2 -microglobulina (N=3)

5.7.2 Verificação da reversão do fenótipo MDR1

Os efeitos dos tratamentos com oligonucleotídeos antissenso na expressão do gene MDR1 de células de sarcoma uterino podem ser observados nas tabelas 4, 5 e 6.

Ambos os oligos AS1 e AS2, quando complexados à LDE e pré-incubados com HDL na presença de SDL, foram capazes de inibir em cerca de 70% do mRNA da p-glicoproteína após 48 horas de incubação. Contudo, após 72 horas a expressão já havia sido retomada, com uma expressão ao redor de 60%.

Tabela 4 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 24 horas de incubação com diferentes meios

Variação da expressão (%)					
Tratamento	SFB	AS1	AS1/LDE	AS2	AS2/LDE
Pré-incubação					
SFB	99,8 ± 3,0	96,4 ± 2,9	69,9 ± 4,6	77,3 ± 4,6	72,6 ± 2,0
SFB+ LDL	96,7 ± 2,0	98,1 ± 1,5	67,7 ± 3,2	79,2 ± 4,3	79,4 ± 4,5
SFB+HDL	100,0 ± 3,0	92,7 ± 4,0	56,1 ± 2,7	73,0 ± 2,5	59,6 ± 2,5
SDL	97,2 ± 1,8	78,5 ± 4,6	92,3 ± 2,9	80,0 ± 3,5	86,2 ± 3,3
SDL+LDL	98,4 ± 4,2	81,9 ± 4,3	74,0 ± 1,5	64,3 ± 3,4	72,9 ± 1,0
SDL+HDL	96,9 ± 2,3	77,6 ± 2,5	39,4 ± 4,0	55,1 ± 1,9	37,8 ± 2,2

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos

Tabela 5 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 48 horas de incubação com diferentes meios

Variação da expressão (%)					
Tratamento	SFB	AS1	AS1/LDE	AS2	AS2/LDE
Pré-incubação					
SFB	95,2 ± 2,7	91,4 ± 2,4	75,0 ± 3,4	75,6 ± 1,6	60,1 ± 3,6
SFB+ LDL	98,4 ± 2,6	89,3 ± 3,4	60,6 ± 2,2	83,2 ± 2,6	56,7 ± 2,5
SFB+HDL	98,1 ± 3,0	82,5 ± 3,1	53,8 ± 2,5	60,1 ± 3,6	47,5 ± 4,1
SDL	94,6 ± 2,5	77,4 ± 1,6	85,0 ± 2,4	81,3 ± 2,7	82,6 ± 2,3
SDL+LDL	97,2 ± 2,9	78,9 ± 2,6	47,5 ± 3,4	55,4 ± 2,0	64,9 ± 4,2
SDL+HDL	99,1 ± 2,6	70,3 ± 3,6	29,4 ± 3,1	52,2 ± 2,7	29,8 ± 1,5

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos

Tabela 6 - Variação da expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino tratadas com OAS ou complexo OAS/LDE, após 72 horas de incubação com diferentes meios

Variação da expressão (%)

Tratamento	SFB	AS1	AS1/LDE	AS2	AS2/LDE
Pré-incubação					
SFB	97,6 ± 4,4	95,2 ± 4,5	78,2 ± 2,5	90,1 ± 2,9	77,3 ± 4,0
SFB+ LDL	98,1 ± 3,9	93,1 ± 0,9	68,7 ± 2,4	95,0 ± 2,9	81,7 ± 2,4
SFB+HDL	97,2 ± 3,9	87,9 ± 4,9	63,9 ± 4,1	94,0 ± 3,6	69,5 ± 3,6
SDL	99,4 ± 2,6	80,9 ± 2,9	93,8 ± 4,5	89,4 ± 2,9	82,9 ± 2,0
SDL+LDL	95,2 ± 2,7	81,6 ± 2,9	66,0 ± 0,9	57,9 ± 3,7	69,7 ± 3,8
SDL+HDL	98,4 ± 2,0	75,4 ± 3,6	57,3 ± 4,9	72,5 ± 2,5	61,5 ± 3,8

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos

Quando as células eram incubadas com o complexo oligo-AS1/LDE houve uma diminuição, ainda maior, da expressão do gene MDR1, com níveis máximos de expressão da ordem de 60%, indicando que a inibição foi de cerca de 40% nas células cuja pré-incubação foi feita na presença de SFB. Já as células que foram pré-incubadas com SDL, mostraram baixos níveis de inibição na faixa de 10 a 20% apenas, provavelmente devido à ausência de moléculas doadoras de apoproteína. A inibição foi maior quando na pré-incubação com SDL foi adicionada LDL (40-60% de inibição) e, ainda maior com HDL, apresentando inibição de cerca de 60-75% da expressão deste gene.

A incubação com o oligo AS2 isolado mostrou pouca inibição da expressão, sendo o melhor resultado obtido neste sentido, aquele das células cujo OAS foi pré-incubado com SDL contendo HDL, de pouco mais que 30%. Já quando este OAS apresentava-se complexado a LDE, os níveis de inibição aumentaram sensivelmente, chegando a cerca de 75% de inibição em relação às células não tratadas.

A figura 21 mostra os resultados descritos nas tabelas 4, 5 e 6 permitindo sua melhor visualização.

Figura 21 - Análise comparativa dos diferentes tipos de tratamentos, com as várias condições de pré-incubação nos tempos de: 24, 48 e 72 horas

5.8 Verificação da sensibilidade das células tratadas com o complexo OAS/LDE a concentrações crescentes de doxorrubicina

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas com diferentes concentrações de doxorrubicina, por 2 dias consecutivos, tendo como controle células de sarcoma uterino em meio com 10% LPDS. Foi utilizado como tratamento prévio à incubação com $0,4\mu\text{M}$ de oligonucleotídeo antissenso (OAS) na presença de LDE ($0,7\mu\text{M}$) e HDL ($47\mu\text{g/ml}$). Também foi realizada a incubação com diferentes concentrações de doxorrubicina em células incubadas somente na presença de LDE e HDL.

Os resultados das células de sarcoma uterino resistentes que foram incubadas com o complexo OAS/LDE está figura 22 (A), e das que foram incubadas somente com a LDE na figura 22 (B).

Figura 22 - Citotoxicidade de doxorrubicina em células de sarcoma uterino resistente a múltiplas drogas. **A:** as células foram previamente incubadas com $0,4\mu\text{M}$ de oligonucleotídeo antissenso, $0,7\mu\text{M}$ de LDE e $47\mu\text{g/ml}$ de HDL. **B:** as células foram previamente incubadas $0,7\mu\text{M}$ de LDE e $47\mu\text{g/ml}$ de HDL (n=3)

Verificou-se que quando as células eram incubadas por 24 horas com OAS e posteriormente com diferentes concentrações de doxorubicina, em concentração superior a 10^{-8} M, efeitos citotóxicos para as células tratadas. Após 24 horas de incubação com doxorubicina, a viabilidade das células apresentou queda, que foi diretamente proporcional à concentração de droga no meio de cultura.

As células de sarcoma uterino resistentes, quando não foram previamente incubadas com OAS, apresentaram viabilidade celular, após 24 horas de incubação, superior às células tratadas. Só houve morte celular nas concentrações superiores a 10^{-6} M de doxorubicina. Enquanto que as células tratadas com a maior concentração de doxorubicina testada (10^{-5} M) apresentaram 60,02% de viabilidade celular, as não tratadas apresentaram viabilidade de 79,73%.

As células foram, então, tratadas ou não com OAS por 48 horas, e posteriormente incubadas com diferentes concentrações de doxorubicina, por também 48 horas. Nas células tratados com OAS e doxorubicina a morte celular ocorreu proporcionalmente à concentração de droga no meio de cultura. Na maior concentração testada (10^{-5} M) apresentou somente 24,31% de viabilidade.

As células de sarcoma uterino resistentes, quando não foram previamente incubadas com OAS, apresentaram viabilidade celular, após 48 horas de incubação, superior às células tratadas. Só houve morte celular nas concentrações superiores a 10^{-6} M de doxorubicina.

6. Discussão

Oligonucleotídeos antissenso (OAS) agem como inibidores da função de genes, ligando-se à fita oposta do RNA mensageiro ou dupla fita de DNA, prevenindo, assim, que o mRNA codifique uma proteína funcional (Uhlmann & Peyman, 1990). Apesar da seleção apropriada da seqüência alvo, a absorção celular de OAS é de grande importância e um dos fatores limitantes, quanto a eficácia. (Kronenwett & Haas, 1998).

OAS livres são fracamente internalizados pelas células, sendo necessárias grandes quantidades para se obter atividade antissenso. O uso de vetores melhora a internalização dos OAS, alteram sua distribuição intracelular e aumentam sua atividade (Garcia-Chaumot *et al.*, 2000).

Vários sistemas vêm sendo desenvolvidos para a entrega seletiva de OAS. Inicialmente utilizaram-se vetores virais (Friedmann, 1997), entretanto, o uso destes vetores é limitado a pequenas seqüências de OAS, bem como apresenta uma variedade de prejuízos ao paciente, como toxicidade e respostas imune e inflamatória (Tiera *et al.*, 2006).

Vetores não virais são baseados em lipídeos, polímeros ou a combinação de ambos. Entre os mais utilizados estão os lipossomos, os quais, entretanto, apresentam baixa eficiência quando comparados aos vetores virais (Khalil *et al.*, 2006). No presente trabalho, aprofundamos o estudo de que uma nanopartícula (LDE) pode ser utilizada como vetor de oligonucleotídeos antissenso, de maneira a possibilitar seu direcionamento às células-alvo. Como modelo experimental, foi estudada a reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas em linhagem celular humana de sarcoma uterino.

O uso de uma emulsão lipídica (LDE) como vetor para oligonucleotídeo antissenso foi proposto inicialmente por Bydlowski *et al.*, (1995), onde foi demonstrado que oligonucleotídeos sem a presença de colesterol não são capazes de se ligarem a LDE. A utilização de oligonucleotídeos antissenso conjugados a colesterol, vem sendo empregada. A presença do colesterol na extremidade 5' aumenta a eficiência dos OAS em serem internalizados (Krieg *et al.*, 1993). Por sua vez, Rensen *et al.*, (1997) demonstraram que lipossomos enriquecidos com apoE poderiam usar a via de LDLr como alvo seletivo.

Neste estudo, o emprego de oligonucleotídeos antissenso com colesterol na extremidade 5' possibilitou a ligação do OAS com a emulsão lipídica, a qual ocorreu de forma eficiente. Para que esta ligação ocorresse, necessitou-se apenas colocar o OAS em contato com a LDE.

Em estudos anteriores, do mesmo grupo, o OAS era incubado juntamente à LDE, ambos em excesso, durante 3 horas em banho-maria a 37°C. Necessitava-se, então, separar o OAS que estava complexado à LDE daquele que estava livre. Esta separação era feita através da técnica de gel filtração, sendo necessárias aproximadamente 18 horas para se obter a LDE ligada ao OAS.

O uso de métodos físico-químicos permitiu calcular a constante de ligação aproximada e, desta forma, conhecer-se o quanto de OAS é necessário para saturar a LDE. Verificou-se que a quantidade de 0,4µM de oligo se liga a 0,7µM de LDE. A constante de ligação foi $4,2 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$.

A LDE aqui empregada foi uma nanopartícula, com diâmetro médio de 37nm, população heterogênea e, assim como ocorre com a LDL, apresentou diferentes tamanhos (Alberts *et al.*, 2006). A presença do OAS ligado à LDE, não alterou o seu diâmetro.

A análise de interiorização do complexo OAS/LDE foi realizada através de microscopia de fluorescência, utilizando-se diferentes incubações para definir qual seria a melhor condição para uso da LDE como vetor de OAS. Todos os experimentos foram realizados com a concentração ideal determinada pela constante de ligação do OAS à LDE.

Neste trabalho, células incubadas com OAS livre em meio de cultura na presença de soro deficiente de lipoproteínas, apresentaram pequena intensidade de fluorescência. Alahari *et al.* (1996) demonstraram que a presença do grupo colesterol ligado à extremidade 3' do OAS era capaz de levar à interiorização de uma pequena quantidade de OAS, sem necessidade de um vetor. Em nossos experimentos, células incubadas com o complexo OAS/LDE, sem a presença de lipoproteínas, apresentaram baixa intensidade de fluorescência. Este achado sugere que o colesterol do OAS esteja ligado à LDE, a qual, por não apresentar parte protéica, não interage com o receptor de LDL – este último, a possível via de internalização do complexo - e, conseqüentemente, não seja interiorizado pelas células.

Células incubadas com OAS em meio contendo soro fetal bovino (SFB) apresentaram grande fluorescência. É provável que lipoproteínas do SFB, principalmente a LDL, sirvam de vetor para o transporte dos OAS para as

células via receptor de colesterol. O complexo OAS/LDE, quando pré-incubado com a HDL, aumentou a intensidade da fluorescência em relação ao OAS na presença das lipoproteínas do SFB.

A necessidade de células tumorais por colesterol, sugere que o crescimento do tumor possa ser impedido, limitando-se a quantidade de colesterol ou inibindo sua síntese. De outra forma, a absorção seletiva de LDL pelas células tumorais leva à possibilidade de utilização da LDL como carregadora de quimioterápicos. A dificuldade de se isolar LDL de plasma humano, limita sua aplicação farmacêutica (Rensen *et al.*, 1996). Por outro lado, a LDE pode ser internalizada através da via de receptores de LDL, constituindo uma importante alternativa como vetor.

Estudos realizados por Goldstein *et al.*, (1983) demonstram que ao utilizar-se LDL marcada radioativamente em células de fibroblasto humano, na presenças de soro deficiente de lipoproteínas, ocorria ligação de alta afinidade entre a LDL marcada e o seu receptor. Quando a incubação era feita a 4°C, 90% da LDL radioativa permanecia ligada à superfície celular, enquanto que a 37°C, a LDL era internalizada pelas células e degradada.

Apesar de não conter apoB, a LDE pode adquirir apoE quando em contato com a HDL. Dada a propriedade da apoE de também se ligar aos receptores de LDL, inclusive com maior afinidade do que a apoB, a afinidade da LDE pelos receptores é maior que a da LDL nativa (Hirata *et al.*, 1999; Maranhão *et al.*, 1997).

A interiorização da LDE marcada com [^3H] pelo receptor de LDL foi aqui demonstrada em células de sarcoma uterino resistentes. Quando incubadas a 4°C , as células não são capazes de interiorizar LDE, sendo que a maior parte da radioatividade permaneceu na membrana. O emprego de LDL como competidor pelo receptor de LDL, promoveu queda da concentração de radioatividade que estava ligada à membrana. Assim como é relatado para a LDL, espera-se que a 37°C ocorra a internalização e provável degradação da LDE. Neste estudo, observou-se a diminuição da quantidade total de radioatividade e o aumento da quantidade de LDE no meio de cultura, ao se utilizar LDL como competidor. Assim, o complexo OAS/LDE é, provavelmente, interiorizado através de endocitose mediada por receptor de LDL.

A distribuição intracelular do OAS foi analisada por microscopia confocal, sendo que o OAS foi internalizado juntamente com a LDE, apresentando distribuição intracelular homogênea, após 24 horas de incubação em soro deficiente de lipoproteínas. Observou-se distribuição tanto citoplasmática quanto nuclear. Após 48 horas de incubação em soro deficiente de lipoproteínas, não houve presença de fluorescência no núcleo, mas sim uma maior concentração de fluorescência na área próxima à membrana plasmática. Foram visualizados corpúsculos com alta concentração de fluorescência fora das células. A presença do corpúsculo pode estar correlacionada com a utilização do oligonucleotídeo scramble, uma vez que estes não apresentam inibição do gene MDR1. As células utilizadas apresentavam expressão do gene MDR1. A P-glicoproteína pode estar retirando o OAS da célula. Por outro lado,

não se pode afastar a hipótese que estes corpúsculos tenham sido originados por artifício devido à técnica de fixação. Mais estudos seriam necessários para poder entender a presença deste corpúsculo.

A expressão máxima da atividade do receptor de LDL requer que as células estejam crescendo ativamente. Com isto as células necessitam de grande quantidade de colesterol para síntese de novas membranas. Para induzir de forma máxima o receptor, também é necessário privar as células de fonte exógena de colesterol (Goldstein *et. al.*, 1983). Preparou-se, a partir de plasma, soro deficiente de lipoproteínas (SDL), no qual foram realizadas determinações de colesterol, triacilglicerois e proteínas. Foi realizada, ainda, eletroforese em acetato de celulose visando determinar possíveis contaminações com lipoproteínas. A presença de 2,3% de colesterol em relação ao colesterol do plasma e a ausência de bandas, quando realizado eletroforese de lipoproteínas, demonstraram que o SDL não continha contaminação por outras lipoproteínas. Os mesmos procedimentos foram realizados para a LDL e a HDL.

Analisando-se a citotoxicidade da LDL, esta mostrou-se elevada para a linhagem celular de sarcoma uterino resistente à doxorrubicina. A maior concentração empregada foi 1,25mg/ml de LDL, a qual também foi a mais citotóxica, com 100% de morte celular após 48 horas. É relatado na literatura que células que expressam o gene MDR1 apresentam metabolismo alterado de LDL, com aumento da captação desta lipoproteína (Tatidis *et. al.*, 2002). Neste estudo, a alteração metabólica promovida pelo MDR, pode estar levando ao

aumento da citotoxicidade da LDL. Tanto o complexo OAS/LDE como a LDE pré-incubada com HDL não apresentaram citotoxicidade para a linhagem celular, nos tempos e concentrações testados.

Para analisar o comportamento do receptor de LDL em células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina, estas células foram carenciadas de lipoproteínas por até 72 horas. Através da análise da expressão do gene do LDLr, por RT-PCR, observou-se a existência de uma banda de 486pb, correspondente ao receptor de LDL, previamente ao carenciamento. Quando as células foram privadas de lipoproteína, observou-se aumento da expressão do LDLr, sendo que, após 72 horas, este aumento foi de 2,5 vezes.

O uso do gene de resistência a múltiplas drogas como modelo para terapia gênica, tem se mostrado bastante eficiente (Alahari, *et.al.*, 1996; Motomura, *et. al.*, 1998). A proteína codificada pelo gene MDR1 (ABCB1), a P-gp, funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, o que resulta em diminuição do acúmulo intracelular de agentes citotóxicos em células tumorais (Lee *et al.*, 1996). A maioria dos agentes quimioterápicos é degradada na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática, difundindo-se em um gradiente de concentração. A P-gp atua de modo contrário, expulsando esses agentes para o meio extracelular (Ambudkar *et al.*, 2003).

Oligonucleotídeos antissenso que empregam o gene MDR1 como alvo para terapia gênica vêm sendo estudados nos últimos anos. Alahari *et al.*, (1998) propuseram alterações no esqueleto de fosfato dos OAS, visando diminuir a degradação dos mesmos. Desta forma, os OAS modificados foram

capazes de inibir entre 50 – 70% da expressão do gene MDR1 em células NIH 3T3 transfectadas com este gene. Motomura *et al.* (1998), empregando linhagem celular de leucemia (K562), demonstraram ser possível inibir a P-glicoproteína através do uso de lipossomos catiônicos como vetor de OAS.

Brigui *et al.* (2002), demonstraram que a natureza química do OAS e a escolha do vetor para inibição do MDR, constituem fatores determinantes para a ação do oligonucleotídeo antissenso, sendo OAS fosforotioato mais eficientes que OAS fosfodiester. O uso conjunto de OAS com drogas citotóxicas também vem sendo utilizado: Ren *et al.* (2004) e Pankilu *et al.* (2006) associaram o OAS à doxorrubicina (Dox) com intenção de inibir a P-gp e, assim, aumentar a atividade antitumoral da Dox.

A análise de expressão do gene MDR1, neste estudo, foi realizada por RT-PCR semi-quantitativo. Para tal, foram empregadas duas linhagens celulares de sarcoma uterino, uma sensível à doxorrubicina e a outra, resistente. As células de sarcoma uterino sensíveis não expressam o gene MDR1 e, conseqüentemente, não tem a expressão da P-glicoproteína.

Os RNAs totais das células sensíveis e resistentes foram quantificados por espectrofotometria, bem como normalizados por densitometria da banda 28S. A curva consistiu em diferentes concentrações do RNA total das células resistentes, diluídas em RNA total de células sensíveis, as quais não expressam MDR1. A quantidade de RNA total presente em cada uma das diluições foi constante, realizando-se RT-PCR nas condições já padronizadas. Construiu-se uma curva, onde o tubo que continha apenas RNA total de células

sensíveis representou 0% de expressão e o que continha apenas RNA total de células resistentes correspondeu a 100% de expressão do gene MDR1. O produto do gene para β_2 microglobulina foi empregado como controle de amplificação. O uso da curva de semi-quantificação possibilitou a análise das alterações de expressão do gene MDR1.

Neste estudo, foram utilizados dois oligonucleotídeos antissenso complementares a diferentes locais do códon AUG do gene MDR1. Estes OAS, previamente incubados com HDL ou LDL, foram então colocados na presença de SFB ou SDL. Quando as células foram incubadas em meio contendo SFB, nos dois diferentes meios de pré-incubação, observou-se expressão do gene MDR1 superior a 95%. Desta forma, tanto o uso da HDL como o da LDL não interferiu na expressão do gene MDR1, assim como o uso de SFB ou SDL.

A incubação com AOS livre AS2, inibiu a expressão do gene MDR1 em até 50%. Por sua vez, AS1 foi capaz de inibir em 30% a expressão do gene, conforme a incubação realizada. Achado similar foi relatado por Alahari *et al.*, ao demonstrarem que OAS fosforotioatos possuidores de uma molécula de colesterol na extremidade inibiam até 50% da expressão do gene MDR1.

Em nosso estudo, verificou-se que a incubação com o complexo OAS/LDE foi capaz de inibir a expressão do gene MDR1. Esta inibição variou entre 7% e 70%, dependendo de meio utilizado na pré-incubação do complexo.

O complexo OAS/LDE, quando incubado na presença de SDL, promoveu baixos níveis de inibição tanto para AS1 como para AS2. Na presença de SFB,

por sua vez, estas células mostraram 25% de inibição do gene MDR1, quando empregado o complexo com seqüência AS1, e 40% para o possuidor de AS2. Segundo observado por Debes-Bravo (2002), a presença de lipoproteínas do SFB poderia promover a troca, pelos OAS, da LDE por lipoproteínas plasmáticas. Desta forma, poderia ocorrer a entrada celular destes OAS carregados pelas lipoproteínas, apresentando, assim, efeito antissenso.

O acréscimo de lipoproteínas ao meio que continha SFB, pode ter conduzido, aqui, ao aumento da captação do complexo pelas células. Por sua vez, isto conduziu ao aumento da inibição do MDR1. A inibição observada quando o complexo OAS/LDE foi incubado com SDL na presença de LDL foi de 52,5% para o AS1 e 35,1% na AS2.

A mais intensa inibição foi obtida ao incubar-se as células com o complexo OAS/LDE em SDL e na presença de HDL. Observou-se que ambas as seqüências de OAS eram capazes de inibir 70% da expressão da P-glicoproteína. Uma possível explicação para este achado é que a linhagem celular de sarcoma uterino resistente a doxorrubicina foi privada de lipoproteínas, o que levou ao aumento da concentração de receptor de LDL. Desta forma, o complexo foi capaz de obter a apolipoproteína E da HDL e, assim, de interagir com o receptor de LDL. A captação do complexo, provavelmente pelo receptor de LDL, conduziu à maior inibição do gene MDR1, tendo sido encontrados os melhores resultados após 48 horas de incubação.

Após 72 horas a 37°C, independentemente da sequência ou meio de incubação, ocorreu aumento da expressão do gene MDR1, a qual poderia ser explicada pela insuficiência de OAS na célula para manter a inibição.

Testou-se, ainda, a inibição do gene MDR1 pelo complexo OAS/LDE na presença de uma droga citotóxica, visando observar se a inibição deste gene levaria a mudanças na funcionalidade da P-glicoproteína, a qual é produto do gene MDR1. Utilizou-se doxorrubicina pelo período de até 48 horas, pico máximo de inibição do MDR1, em experimentos realizados com células tratadas e não tratadas pelo complexo OAS/LDE.

Após 48 horas de incubação, as células tratadas apresentaram 24,31% de viabilidade celular com a concentração de 10^{-5} M de doxorrubicina. Por sua vez, 48,21% das células não tratadas demonstraram viabilidade. O início da toxicidade da doxorrubicina nas células tratadas ocorreu na concentração de 10^{-9} M, enquanto que nas células não tratadas, a morte celular ocorreu a partir da concentração de 10^{-6} M. A diminuição da expressão da P-glicoproteína, portanto, aumentou a citotoxicidade da doxorrubicina.

Neste estudo, a LDE demonstrou-se um prático e eficiente vetor para o transporte intracelular de OAS possuidores de colesterol, sendo necessário apenas o contato entre a nanoemulsão lipídica e o oligo para a formação do complexo. A interiorização de OAS/LDE dá-se, principalmente, através do receptor de LDL e, uma vez interiorizados, os OAS apresentam distribuição tanto citoplasmática como nuclear. Foram capazes, ainda, de inibir a expressão do gene MDR1 em linhagem celular de sarcoma uterino resistente à

doxorubicina, fato que propiciou o aumento da citotoxicidade da droga em células a ela submetidas.

7. Conclusões

- Oligonucleotídeos antissensos se ligam a nanoemulsão lipídica (LDE) com constante de ligação $4,2 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$, sendo necessário somente o contato entre o OAS e a LDE para que ocorra a ligação;
- O complexo formado pelo OAS/LDE é interiorizado pelas células de sarcoma uterino, apresentando distribuição citoplasmática e nuclear. A via de internalização do complexo é, em grande parte, o receptor de LDL;
- Os OAS transportados pela LDE são capazes de inibir a expressão do gene MDR1. Encontrou-se maior inibição quando os dois complexos OAS/LDE eram pré-incubados com a HDL. Ocorreu também, inibição da função do produto do gene MDR1, a P-glicoproteína.
- A LDE é um sistema potencialmente promissor para ser utilizado como vetor de OAS para atuar na regulação gênica em células que expressam receptores de apo E/B.

8. Referências Bibliográficas

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol*. 2001;82:84-7.

Akhtar S, Juliano RL. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends Cell Biol*. 1992;2:139-144.

Alahari SK, Dean NM, Fisher H, Delong R, Manoharam M, Tivel KL, Juliano L. Inhibition of expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein by phosphorothioate and 5'cholesterol-conjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*. 1996;50:808-819.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4^a edição, 2006;p.750.

Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 2003;22:7468-85.

Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett*. 1967;37:3557-62.

Bennet CF, Chiang MY, Chan H, Shomaker JE, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance uptake and activity of phosphorothioated antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*. 1992;41:1023-33.

Bergman PJ. Mechanisms of anticancer drug resistance. *Veterinary clinical small animal*. 2003;33:651-67.

Biaggi MH, Schreier S, Castricci AM, Lamt-Freund MT. Interaction of melanotropic peptides with lipid membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;680:459-61.

Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to Actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970;30:1174-84.

Bilheimer DW. The lipoprotein receptor concept. *Drugs*. 1988;36:55-62.

Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B. Mechanism of multidrug transporter. *FEMS Microbiol Rev*. 1997;21:55-84.

Borst P, Evers R, Koel M, Wijnholds J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *J. Nat Cancer Inst*. 2000;92:1295-

302.

Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: a review. *Acta oncol* 1991;30:87-105.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brieier A, Barancik M, Sulová Z, Uhrik, B. P-glycoprotein – implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targ*. 2005;5:457-68.

Brigui I, Djavanbakht-Samani T, Jolles B, Piagaglio S, Laigle A. Minimally modified phosphodiester antisense oligodeoxyribonucleotide directed against the multidrug resistance gene *mdr1*. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:747-54.

Burch RM, Mahan LC. Oligonucleotides antisense to the interleukine 1 receptor mRNA block the effects of interleukine 1 in cultured murine and human fibroblast and in mice. *J Clin Invest*. 1991;88:1190-96.

Bydlowski SP, Vinagre CG, Bravo LM, Debes AA, Maranhão RC. Synthetic oligonucleotide does not bind to lipid emulsion resembling low-density

lipoprotein. *Ann NY Acad Scie.* 1995;772:252-54.

Carmichael, J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemossensitivity testing. *Cancer Res.* 1987;47:936-42.

Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 1991;66:85-94.

Chaudhary PM, Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:632-39.

Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood.* 1992;80:2735-39.

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR1 (P-Glycoprotein) gene from multidrug-resistance human cells. *Cell.* 1986;47:381-89.

Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. Heart shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance 9MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J.Biol Chem.* 1990;265:221-26.

Chomczynski P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162: 156-9.

Clarenc JP, Degols G, Leonetti JP, Milhaud P, Lebleu B. Delivery of antisense oligonucleotides by poly(l-lysine) conjugation and liposome encapsulation. *Anticancer Drug Des.*1993;8:81-94.

Cordon-Cardo C, O' Brien JP, Casals D. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:695-98.

Crooke ST, Progress in antisense technology: the end of the beginning. *Meth Enzymol.* 1999;313:3-57.

Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1973;323:466-83.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11:1156-66.

Debes-Bravo AG. Utilização de emulsão lipídica como vetor de oligonucleotídeo antissenso. Tese, Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, 2002.

Debry P, Nash EA, Neklason DW, Metherall TE. Role of multidrug resistance proteins in cholesterol esterification. *J. Biol. Chem.* 1997;272:1026-31.

DeLong RK, Yoo H, Alahari SK, Fisher M, Short SM, Kang SH, Kole R, Janout V, Regan SL, Juliano RL. Novell cationic amphiles as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Nucl Acid Res.* 1999;27:3334-41.

Dias N, Stein CA. Potential role of antisense oligonucleotides in câncer therapy. The example of BCL-2 antisense oligonucleotides. *Euro J Pharma Biopharma.* 2002;54:263-69.

Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein –mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem.* 1990;58:137-71.

Firestone, RA. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor

compounds to cancer cells. *Bioconjugate Chem.* 1994;5:105-113.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ. Expression of a multidrug resistance gene in human tumor and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:165-9.

Fojo AT, Whang-Peng J, Gottesman MM, Pastan I. Amplification of DNA sequences in human-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7661-5.

Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am.* 1997;276:96-101.]

Garcia-Chaumont C, Seksek O, Grzbowska J, Borowski E, Bolard J. Delivery system for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther.* 2000;87:255-77.

Gerwitz AM, Sokol DL, Ratajczak MZ. Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood.* 1998;3:712-36.

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979;279:679-85.

Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-

density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzimol.* 1983;98:241-60.

Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet.* 1995;29:607-49.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.

Gregory GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The oncologist.* 2003;8:411-24.

Haker, WG, BI Sikic: Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line, MES-SA. *Cancer Res.* 1985;45: 4091-6.

Haker, WG, FR MacKintosh, BI Sikic: Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res.* 1983;43: 4943-50.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.*

1955;34: 1345-53.

Henova T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1488:189-210.

Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:18-21.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganism to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992; 8:67-113.

Hirata RDC, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473:53-62.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein, JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 1978;52:1099-114.

Juliano RL, Alahari S, Yoo R, Cho M. Antisense pharmacodynamics: critical

issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res.* 1999;16:494-02.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455:152-62.

Kalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev.* 2006;58:32-45.

Kaneda Y, Tabata Y. Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.* 2006;97:348-54.

Krieg AM, Tonkinson J, Matson S, Zhao Q, Saxon M, Zhang LM, Bhanja U, Yakubov L, Stein CA. Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5'-cholesterol moiety increases cellular association and improves efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1048-52.

Kritchevsky SB, Wilcosky TC, Morris DL, Truong KN, Tyroler HA. Changes in plasma lipid and lipoprotein cholesterol and weight prior to the diagnosis of cancer. *Cancer Res.* 1991;51:3198-203.

Kronenwett R, Haas R. Antisense strategies for the treatment of hematological malignancies and solid tumors. *Ann Hematol*. 1998;77:1-12.

Krug GD. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene* 2003;22:7262-4.

Kulka, M, Smith CC, Aurelian L, Fischelevich R, Meade K, Miller P, Ts'o PO. Site specificity of the inhibitor effects of oligo(nucleosidemethylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6868-72.

Lappalainen K, Urtti A, Soderling E, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Syrjanen S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1196:201-8.

Lee EH, Sitaraman K, Schuster D, Rashtchian A. A highly sensitive method for one-step amplification of RNA by polymerase chain reaction. *Focus*. 1997;19: 39-42.

Lee PD, Noble-Topham SE, Bell RS, Andrulis IL. Quantitative analysis of multidrug resistance gene expression in human osteosarcomas. *Br J Cancer*.

1996;74:1046-50.

Legendre JY, Trzeciak A, Bohrmann B, Deuschle U, Supersaxo A. Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem.* 1997;8:57-63.

Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The oncologist* 2003;8:411-24.

Liu Q, Ohshima K, Kikuchi M. High expression of *mdr1* gene and p-glycoprotein in initial and re-biopsy specimens of relapse B-cell lymphoma. *Histopathology.* 2001;38:209-16.

Lowry, OH, Hosenburg NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193: 265-75.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993;28:691-96.

Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and

biodistribution of a lipid emulsion resembling low- density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, 1994;54: 4660-66.

Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptor. *Lipids*. 1997;32:627-33.

Mosley ST, Goldstein JL, Brown MS, Falck JR, Anderson RG. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*1981;78:5717-21.

Motumura S, Motoji T, Takanashi M, Wang YH, Shiozaki H, Sugawara I, Aikawa E, Tomida A, Tsuruo T, Kanda N, Mizoguchi H. Inhibition of P-glicoprotein and recovery of drug sensitivity of human acute leukemic blast cells by multidrug resistance gene (MDR1) antisense oligonucleotides. *Blood*. 1998;91:3161-71.

Nakazato K, Ishibashi T, Nagats K, Seino Y, Wada Y, Sakamoto T, Matsuoka R, Teramoto T, Sekimata M, Homma Y, Maruyama Y. Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in circulating human monocytes: its up-regulation by hipoxia. *Athero*. 2001;155:439-44.

Ninpf J, Schneider J. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000;1529:287-98.

Noonan, KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, von Hoff DD, Roninson IB. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:7160-4.

Owens MD, Baillie G, Halbert GW. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int.J.Pharm.* 2001;228:109-117.

Pallares-Trujillo J, Domenech C, Grau-Oliete MR, Rivera-Fillat MP. Role of cell cholesterol in modulating vincristine uptake and resistance. *Int. J. Cancer*. 1993;55:667-71.

Pankulu RI, Wang Y, Saad M, Khandare J, Starovoytov V, Minko T. In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J Control Release*. 2006;114:153-62.

Parente RA, Nir, S, Szoka FC. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle

contents induce by peptide GALA. *Biochem.* 1990;29:8720-28.

Pirollo KF, Rait A, Sleer LS, Chang EH. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol therap.* 2003;99:55-77.

Raaijmakers HGP, Izquierdo HM, Lokhorst HM, Leeuw CDE, Belien JAM, Bloem AC, Dekker AW, Scheper RJ, Sonneveld P. Lung-resistance- related protein expression is a negative predictive factor for response to conventional low but not to intensified dose alkylating chemotherapy in multiple myeloma. *Blood.* 1998;91:1029-36.

Raymond M, Gros P. Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6488-92.

Redenti E, Pietra C, Gerloczy A, Szenté L. Cyclodextrins in oligonucleotide delivery. *Advan. Drug Del. Rev.* 2001;53:235-44.

Ren Y, Zhan X, Wei D, Liu J. In vitro reversal MDR of human carcinoma cell line by an antisense oligodeoxynucleotide-doxorubicin conjugate. *Biomed Pharmacother.* 2004;58:520-6.

Rensen PCN, Schiffelers RM, Verluis J, Bijsterbosch MK, Van Kuijk-Meuwisen MEMJ, Van Berkel TCJ. Human recombinant apolipoprotein E-riched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol. Pharmacol.* 1997;52:445-55.

Rezende BCG, Levy D, Lucas SRR, Bydlowski SP. Mecanismos de resistência a múltiplas drogas. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia.* 2005;30:113-119.

Rhainds D, Brissette L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 1999;31:915-31.

Roland I, Ramires J, Vinagre C, Maranhão RC. Metabolism of LDL-like emulsions in dyslipidemic and normal subjects. *Atheroscl. Thromb.* 1991;11:1490-91.

Roninson IB, Abelson HT, Housman DE, Howell N, Varshavsky A. Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in Chinese hamster cells. *Nature* 1984, 309:626-28.

Roninson IB, Use of in-gel DNA renaturation for detection and cloning of amplified genes. *Methods Enzymol.* 1987;151:332-71.

Schauenstein K, Schauenstein E, Wick G. Fluorescence properties of free and protein bound fluorescein dyes. I. Macrospectrofluorometric measurements. *J Histochem Cytochem*. 1978;26:277-83.

Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM. Human multidrug-resistant cell lines: expression can precede gene amplification. *Science* 1986;232:643-5.

Skovsgaard T. Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Erlich ascites tumor cells. *Cancer Res*. 1978;38:4722-27.

Spiller DG, Tidd DM. Nuclear delivery of antisense oligodeoxynucleotides through reversible permeabilization of human leukemia cells with streptolysin O. *Antisense Res Dev*. 1995;5:13-21.

Stein, EA: Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Textbook of Clinical Chemistry (Ed.: Tietz NW). W.B. Saunders, Philadelphia. 1986; p.829-900.

Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippé L. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Euro J of Cancer* 2006;42:295-309.

Tatidis L, Masquelier M, Vitols S. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:2169-80.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:7735-8.

Thierry AR, Ditschilo A. Intracellular availability of unmodified phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense therapy. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:5691-98.

Tiera MJ, Winnik FM, Fernandes JC. Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives. *Curr Gene Thera.* 2006;6:59-71.

Trent JM, Witkowski CM. Clarification of the chromosomal assignment of the human P-glycoprotein/MDR1 gene: possible coincidence with the cystic fibrosis and c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;26:187-90.

Troost J, Albermann N, Emil HW, Weiss J. Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316:705-11.

Uhlmann E, Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem Rev.* 1990;90:543-83.

Urbatsch IL, Senior AE. Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;316:135-40.

Vasconcellos KVP. Cinética plasmática de uma microemulsão rica em colesterol (LDE) em pacientes com linfoma de Hodking e linfoma não-Hodgkin e estudo preliminar da toxicidade do etoposide associado a LDE. Tese, Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, 2006.

Walder RY, Walder JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleitides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:5011-15.

Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* 1999;77:306-315.

Yu L, Wu Q, Yang CPH, Horwitz SB. Coordination of transcription factors, NF- κ B and C/EBP β , in the regulation of the MDR1b promoter. *Cell Growth Differ.* 1995;6:1505-12.

Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication

and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci USA. 1978;75:280-4.