



2013



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Desenvolvimento de sistemas de base lipídica para e entrega de  
material genético em hepatocarcinoma

### **Desenvolvimento de sistemas de base lipídica para a entrega de material genético em hepatocarcinoma**

Mariana Pereira Magalhães

Mariana Pereira Magalhães

2013



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

### **Desenvolvimento de sistemas de base lipídica para a entrega de material genético em hepatocarcinoma**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Conceição Pedroso de Lima (Universidade de Coimbra)

Mariana Pereira Magalhães



## AGRADECIMENTOS

Ao longo deste ano de dissertação pude contar com o apoio e presença de muitas pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Desde já agradeço ao Doutor Henrique Faneca e à Professora Doutora Conceição Pedroso Lima pela oportunidade que me concederam ao integrarem-me na sua equipa de laboratório do grupo de vectores e terapia génica. Um profundo obrigado ao Doutor Henrique Faneca pela orientação e acompanhamento que me dedicou tão generosamente e pela transmissão dos melhores e mais úteis conhecimentos científicos.

Agradeço também aos trabalhadores e investigadores do Centro de Neurociências e Biologia Celular pela recepção, acolhimento, ajuda e simpatia que me proporcionaram ao longo deste ano. Particularmente aos meus colegas de laboratório e da sala de mestrados por todo o apoio, ajuda, amizade e conselhos que me proporcionaram no desenrolar deste trabalho: à Dina, à Catarina, à Ana M., à Vanessa, à Sarah, à Susana, à Gabriela, à Gladys, ao João, ao Luís R., ao Luís M.

Um enorme agradecimento à pessoa que mais me apoiou e incentivou durante o desenvolvimento da minha dissertação, Daniel. Como também por todo o carinho, paciência, amor e amizade que contribuíram para a minha estabilidade emocional, bastante importante nesta fase.

Agradeço aos meus amigos pela presença durante esta fase e por toda a amizade, ajuda, partilha e apoio, que me fizeram acreditar e sorrir sempre. Um especial obrigado à Laura, à Ana, à Joana, à Catarina, ao Ricardo, à Andreia, à Marisa, à Ana, ao Paulo.

Por último, mas igualmente importante, o meu maior agradecimento à minha família por todos os sacrifícios, ajuda, amor e dedicação incondicional que me têm proporcionado ao longo da minha vida e que tornaram possível a realização desta fase.

A todos o meu mais sincero obrigado.



## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (HCC) é considerado o sexto tipo de cancro com maior prevalência a nível mundial, correspondendo à terceira causa de morte relacionada com doenças cancerígenas. Actualmente, as opções de tratamento para este carcinoma são limitadas, apresentando reduzidas taxas de sucesso. Neste âmbito, os avanços em terapia génica têm-se mostrado promissores na procura e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta patologia. No entanto, o sucesso desta terapia depende da entrega eficiente e específica do material genético às células alvo.

Neste contexto, o principal objectivo deste estudo consistiu no desenvolvimento de uma nova formulação de lipossomas catiónicos, contendo o lípido lactosil-PE para fazer o direccionamento para o receptor da asialoglicoproteína (ASGP-R), uma proteína membranares especificamente expressa em hepatócitos e sobreexpressa em hepatócitos cancerígenos, de modo a promover uma entrega eficiente e específica de material genético às células do HCC.

Os resultados obtidos nos ensaios de transfecção com a linha celular HepG2 mostram que a presença de 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos induz uma potenciação substancial da actividade biológica dos complexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN (+/-) 2/1, não apenas em termos dos níveis de expressão de transgene mas também em termos da percentagem de células transfectadas. Na presença de galactose, a qual compete com o lactosil-PE pela ligação ao ASGP-R, verificou-se uma diminuição da actividade biológica destes complexos, mostrando que a potenciação da transfecção induzida pela presença do lactosil-PE pode dever-se à sua interacção específica com o ASGP-R. Adicionalmente, constatou-se que a presença de lactosil-PE nos lipoplexos promoveu um aumento na sua ligação e internalização celular. Relativamente às características físico-químicas dos lipoplexos, verificou-se que a presença de lactosil-PE resultou num aumento significativo da protecção do ADN e numa diminuição substancial do diâmetro médio e do potencial zeta dos lipoplexos, conferindo-lhe melhores características físico-químicas.

Deste modo, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a potenciação da actividade biológica induzida pela presença de lactosil-PE pode dever-se à sua ligação específica ao ASGP-R, sobreexpresso em HCC, mostrando que lipoplexos constituídos por EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN, na razão de carga (+/-) 2/1, podem constituir um novo sistema de transporte e entrega de material genético para a aplicação de novas estratégias terapêuticas em HCC.



## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the primary hepatic neoplasms of liver cancer and is considered the sixth type of cancer with the highest prevalence worldwide, corresponding to the third cause of death related to cancer diseases. The current treatment options have many limitations and reduced success rates. In this regard, advances in gene therapy have shown promising results in the search and development of novel therapeutic strategies for this pathology. However, the success of this therapy depends on the efficient and specific delivery of genetic material into target cells.

In this context, the main goal of this study was to develop a new formulation of cationic liposomes, containing the lipid Lactosyl-PE targeted to the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), a membrane protein specifically expressed in hepatocytes and overexpressed in HCC cells, for efficient and specific delivery of genetic material into HCC cells.

Transfection studies with HepG2 cells, showed that the presence of 15% of Lactosyl-PE in the formulation of cationic liposomes induces a strong potentiation of the biological activity of these complexes, not only in terms of transgene expression levels but also in terms of percentage of transfected cells. In the presence of galactose, which competes with the Lactosyl-PE for the binding to the ASGP receptor, it was observed a reduction in the biological activity levels, showing that the potentiation of transfection induced by the presence of lactosil-PE could be due to its specific interaction with ASGP-Rs. In addition, it was found that the presence of Lactosyl-PE into lipoplexes promotes an increase in their cell binding and uptake. Regarding the physicochemical properties of lipoplexes, the presence of Lactosyl-PE resulted in a significant increased in the DNA protection and a substantial decrease in the mean diameter and zeta potential of lipoplexes, conferring them better physicochemical properties.

Overall, the results obtained in this study suggest that the potentiation of the biological activity induced by the presence of lactosil-PE could be due to its specific binding to the ASGP-R, overexpressed in HCC, showing that lipoplexes composed by EPOPC:Chol:lactosil-PE (15%)/DNA, in the charge ratio (+/-) 2/1, could constitute a new gene delivery system for application of new therapeutic strategies in HCC.





## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASF</b>	Asialofetuína
<b>ASGP-R</b>	Receptor asialoglicoproteína
<b>ASGP-Rs</b>	Receptores asialoglicoproteína
<b>BCLC</b>	“Barcelona Clinic Liver Cancer”
<b>Chol</b>	Colesterol
<b>COX2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>CRD</b>	Região de reconhecimento de hidratos de carbono
<b>DMEM-HG</b>	Meio de cultura “Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium - High Glucose” para linhas celulares
<b>EPOPC</b>	1-palmitoil-2-oleoil glicero-3-etilfosfocolina
<b>EtBr</b>	Brometo de etídio
<b>FBS</b>	Soro fetal de bovino
<b>GCV</b>	Ganciclovir
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>H1</b>	Subunidade 1 do receptor asialoglicoproteína
<b>H2</b>	Subunidade 2 do receptor asialoglicoproteína
<b>HBS</b>	Tampão salino com HEPES
<b>HBV</b>	Virus da hepatite B
<b>HCC</b>	Hepatocarcinoma
<b>HCV</b>	Virus da hepatite C
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-etano-sulfónico) N´-(2-hidroxietil) piperazina
<b>HepG2</b>	Linha celular humana de um hepatocarcinoma
<b>HSV-Tk</b>	Herpes Simplex Virus-Timidina cinase
<b>Lactosil-PE</b>	Lactosil-fosfotidiletanolamina
<b>MLV</b>	Lipossomas multilamelares
<b>mRNA</b>	ARN mensageiro
<b>miRNA</b>	Micro ARN
<b>PBS</b>	Tampão salino com fosfato
<b>pCMVgfg</b>	plasmídeo contendo o gene que codifica a GFP
<b>pCMVluc</b>	plasmídeo contendo o gene que codifica a luciferase

<b>RISC</b>	“RNA-induced silencing complex”
<b>Rodamina-PE</b>	Rodamina-fosfatidiletanolamina
<b>siRNA</b>	“Small interference RNA”
<b>SUV</b>	Lipossomas pequenos unilamelares

# ÍNDICE

1.	Introdução.....	1
1.1	Hepatocarcinoma.....	3
1.1.1	Epidemiologia e Etiologia.....	4
1.1.2	Factores de Risco.....	6
1.1.3	Tratamento.....	7
1.1.4	Hepatócitos.....	9
1.1.5	Receptor de Asialoglicoproteína.....	10
1.2	Terapia Génica.....	12
1.2.1	Vertentes da Terapia Génica.....	12
1.2.2	Vectores em Terapia Génica.....	14
1.2.3	Complexos lipossoma catiónico/ADN.....	15
1.2.4	Barreiras à entrega de material genético.....	18
1.2.4.1	Barreiras extracelulares.....	19
1.2.4.2	Barreiras intracelulares.....	19
1.3	Terapia Génica aplicada ao Hepatocarcinoma.....	22
1.4	Objectivos.....	24
2.	Materiais e Métodos.....	25
2.1	Cultura Celular.....	27
2.2	Preparação dos lipossomas catiónicos.....	27
2.3	Determinação da concentração lipídica.....	28
2.4	Preparação dos complexos lipossomas catiónicos/ADN.....	29
2.5	Medição da carga superficial dos lipoplexos.....	30
2.6	Medição do diâmetro dos lipoplexos.....	30
2.7	Ensaio da intercalação do brometo de etídio.....	31
2.8	Preparação das células para estudos de transfecção.....	31
2.9	Actividade biológica.....	32
2.9.1	Avaliação da expressão da luciferase.....	32
2.9.2	Avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo.....	33
2.9.3	Avaliação da expressão de GFP por microscopia de fluorescência.....	34
2.10	Ensaio da viabilidade celular.....	34
2.11	Avaliação da ligação e internalização dos complexos.....	35
2.12	Análise estatística.....	36
3.	Resultados e Discussão.....	37

3.1	Efeito do lípido lactosil-PE na actividade biológica dos lipoplexos na linha celular HepG2 .....	39
3.2	Avaliação da citotoxicidade induzida pelos lipoplexos em células HepG2 .....	41
3.3	Efeito do soro na actividade biológica dos complexos lipossoma catiónico/ADN na linha celular HepG2.....	42
3.4	Avaliação da percentagem de transfecção da linha celular HepG2.....	44
3.5	Avaliação dos níveis de transfecção das células HepG2 por Microscopia de fluorescência .....	46
3.6	Efeito da presença de galactose na actividade biológica dos complexos lipossomas catiónicos/ADN na linha celular HepG2.....	48
3.7	Efeito da presença de galactose na viabilidade das células HepG2.....	51
3.8	Avaliação da ligação e internalização dos lipoplexos nas células HepG2 .....	52
3.9	Caracterização físico-química dos lipoplexos.....	55
3.10.1	Avaliação do diâmetro dos lipoplexos.....	55
3.10.2	Avaliação da carga superficial dos lipoplexos .....	56
3.10.3	Avaliação da protecção do ADN pelos lipoplexos .....	58
4.	Conclusão .....	61
5.	Referências Bibliográficas .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenvolvimento do hepatocarcinoma em resultado da presença de diferentes doenças hepáticas ou da presença de factores externos, nomeadamente aflatoxina B1 e o excesso de álcool. *Adaptado de Farazi, P. et al., 2006.* ..... 4
- Figura 2** - Variação global do hepatocarcinoma. Dados para 2008 estimados pela GLOBOCAN (base de dados da agência internacional de investigação sobre cancro). ..... 5
- Figura 3** - Representação dos diversos factores e mecanismos que originam o hepatocarcinoma (HCC). As caixas vermelhas apresentam os principais factores, as caixas azuis mostram os factores secundários, as setas indicam os principais processos e as setas a tracejado indicam processos secundários. *Yan Li et al., 2012* ..... 7
- Figura 4** - Ilustração da composição do lóbulo hepático. A unidade estrutural e funcional do fígado. *Adaptado de Yamadaa, M., et al., 2012.* ..... 9
- Figura 5** - Estrutura molecular do receptor de asialoglicoproteína. *Adaptado de Springer Images* ..... 10
- Figura 6** - Ilustração do mecanismo de actuação da estratégia de terapia génica com genes suicidas, HSV-Tk/GCV. *McCormick, F., 2001.* ..... 14
- Figura 7** - Estrutura química do lípido catiónico 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC), em que este é composto por um grupo hidrofóbico, um grupo polar e um grupo de ligação que une a parte hidrofóbica à parte polar. .... 16
- Figura 8** - Representação esquemática das barreiras biológicas associadas à entrega do material genético. *Pathak, A. et al., 2009.* ..... 18
- Figura 9** – Representação esquemática das diferentes vias de entrada nas células. *Adaptado de Parton, R. G. et al., 2007.* ..... 20
- Figura 10** – Exemplificação do mecanismo de flip-flop e endocitose dos lipoplexos. (1) O lipoplexos começa a ser endocitado. (2) Destabilização da membrana, indução do “flipping” dos lípidos aniónicos do folheto citoplasmático para o folheto lumenal. (3) Os lípidos aniónicos e os lípidos catiónicos do lipoplexo formam pares de iões de carga neutra. (4) Deslocação do ADN e libertação para o citoplasma. *Adaptado de Medina-Kauwe et al., 2005.* ..... 22
- Figura 11** - Efeito do lípido lactosil-PE, na formulação dos lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, na expressão dos níveis de gene da luciferase na linha celular HepG2. Os lipoplexos foram preparados na razão de carga (+/-) (2/1) e (4/1), na ausência ou presença do referido lípido (com 10%, 15% ou 20% do lípido) ou preparados com 20 µg de asialofetuína/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN. Após terem sido preparadas as diferentes formulações, foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro.

Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de dois ensaios independentes. Os asteriscos ( \*\*\* p <0,001) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos , EPOPC:Chol/ADN, associados à asialofetúina. Estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com lipoplexos preparados apenas com EPOPC:Chol na sua constituição lipídica..... 40

**Figura 12** – Efeito dos complexos lipossomas catiónicos/ADN na viabilidade das células HepG2. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue como descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os dados deste ensaio foram expressos em viabilidade de células de percentagem de controlo, células sem tratamento, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) representativos de dois ensaios independentes..... 42

**Figura 13** – Efeito da presença de soro na eficiência de transfecção dos lipoplexos em células HepG2. Foi avaliada a capacidade de transfecção das formulações de lipoplexos, EPOPC:Chol/ADN, com ou sem 15% do lípido lactosil-PE, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, assim como, da formulação referência, ASF-EPOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1. Os complexos foram incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro e sem soro a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos ( \*\*\* p <0,001; \*\* p <0,01) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, na razão de carga (+/-) 2/1, e com os complexos associados à ASF na ausência de soro, os quais diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos complexos na presença de soro..... 43

**Figura 14** - Efeito do lípido lactosil-PE na percentagem de células HepG2 transfectadas com a formulação de lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/DNA. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas os lipoplexos controlo (EPOPC:Chol/ADN) e a formulação referência (20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1). Após terem sido preparadas as diferentes formulações, foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro. A percentagem de células transfectadas, expressando GFP, foi obtida 48 horas depois da transfecção, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de duplicados) representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos ( \*\*\* p <0,001) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% do lípido lactosil-PE na formulação, para a razão de carga (+/-) 2/1, ou para lipoplexos, EPOPC:Chol/ADN associados à asialofetúina, uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com lipoplexos preparados apenas com EPOPC:Chol na mesma razão de carga. .... 44

**Figura 15** – Histogramas de citometria de fluxo obtidos nos estudos de transfecção de células HepG2 com várias formulações. O traçado a vermelho corresponde a histogramas das células transfectadas com os diferentes complexos utilizados. O traçado a verde corresponde a

histogramas de células controlo, as quais não sofreram tratamento (células não transfectadas). O traçado a azul corresponde histogramas resultantes da subtração dos histogramas das células controlo (traço azul) aos histogramas das células transfectadas com os vários complexos (traço vermelho). A) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (2/1); B) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (2/1); C) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1); D) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (4/1); E) ASF-EPOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1). ..... 45

**Figura 16** - Efeito do lípido lactosil-PE na eficiência de transfecção dos lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE em células HepG2. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas as formulações controlo (EPOPC:Chol/ADN) na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Após terem sido preparadas as diferentes formulações, estas foram incubadas com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro. As células transfectadas, que expressam GFP, foram obtidas 48 horas após a transfecção e analisadas por microscopia de fluorescência com uma ampliação de 20x. Este ensaio é representativo de três ensaios independentes. A) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (2/1); B) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (2/1); C) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1); D) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (4/1). ..... 47

**Figura 17** – Efeito da galactose na actividade biológica dos lipoplexos. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas a condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) e a condição referência (20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN). Os lipoplexos foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro na ausência ou presença de 40 mg galactose/mL Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg), em que os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*\*) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% lactosil-PE e para os lipoplexos referência (com ASF), uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos lipoplexos, na ausência de galactose. .... 49

**Figura 18** - Efeito da presença de galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas com lipoplexos. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas a condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) e a condição referência (20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN). Os lipoplexos foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro na ausência ou presença de 40 mg galactose/mL. A percentagem de células transfectadas, expressando GFP, foi obtida 48 horas depois da transfecção, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de duplicados) representativos de pelo menos dois ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*\*) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% lactosil-PE e para lipoplexos sem lactosil-PE, na presença de galactose, uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos lipoplexos, na ausência de galactose. .... 51



**Figura 19** - Efeito da presença de galactose e de lipoplexos na viabilidade celular das células HepG2. A concentração de solução de galactoses adicionada ao meio com as células foi de 40 mg galactose/mL. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue como descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os dados deste ensaio foram expressos em percentagem de viabilidade de células controlo, células sem tratamento, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) representativos de três ensaios. .... 52

**Figura 20** – Avaliação da ligação (A) e internalização celular (B) das diferentes formulações de lipoplexos na linha celular HepG2. Os lipoplexos, preparados com 1% de rodamina-PE, foram preparados na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1 com e sem 15% de lactosil-PE e com 20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1. As células foram depois incubadas com as diferentes formulações na ausência ou presença de 40 mg/mL de galactoses, a 4°C (ligação) ou a 37°C (internalização). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes e foram expressos em RFU/10<sup>6</sup> células. Os asteriscos (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001) correspondem aos valores obtidos para a condição referência (lipoplexos preparados com asialofetúina), no estudo da ligação e internalização celular dos lipoplexos, os quais diferem significativamente dos obtidos com as células tratadas com os mesmos lipoplexos na ausência de galactose. .... 53

**Figura 21** - Avaliação do potencial zeta dos lipoplexos EPOPC:Chol/ADN (condição controlo) e dos lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN. Ambos os complexos foram preparados às razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, como descrito no capítulo 2 – Materiais e Métodos. Os resultados apresentados (média ± desvio padrão) são representativos de dois ensaios independentes. .... 57

**Figura 22** – Avaliação do acesso do brometo de etídio ao ADN dos complexos. Os resultados (média ± desvio padrão de duplicados) são apresentados em percentagem do controlo (apenas ADN) e são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*p <0,01) correspondem aos valores obtidos com os lipoplexos com 15% de lactosil-PE, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, que diferem significativamente dos obtidos com lipoplexos controlo (sem o lípido lactosil-PE) para as mesmas razões de carga. .... 59

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1** - Avaliação do diâmetro médio (nm) dos lipoplexos. Foram utilizados complexos, contendo 15% de lactosil-PE (EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN) e lipoplexos controle (EPOPC:Chol/ADN), ambas as formulações de lipoplexos preparadas nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, como se encontra descrito no capítulo 2 (Materiais e Métodos). Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de 3 medições independentes. .... 56



## 1. INTRODUÇÃO

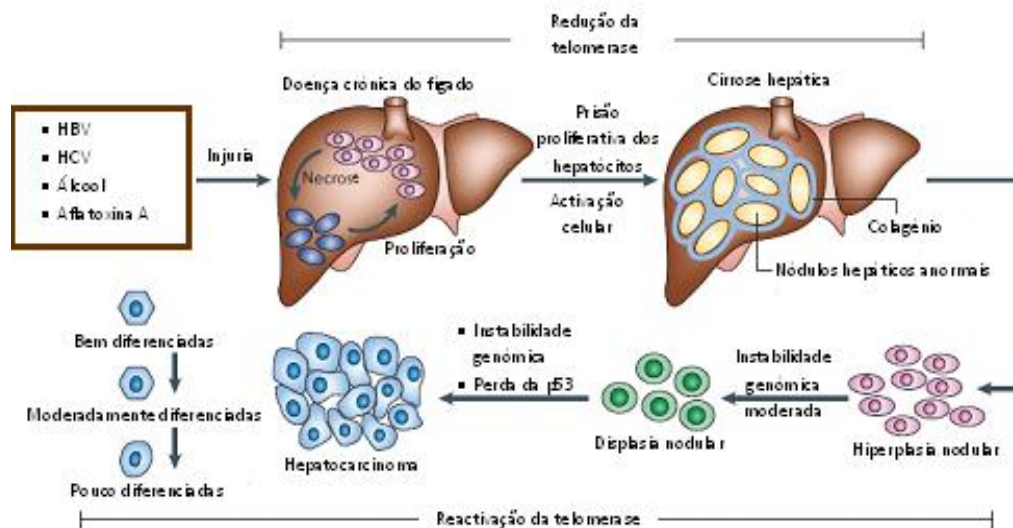


## 1.1 Hepatocarcinoma

O carcinoma hepatocelular (HCC) corresponde a uma das neoplasias hepáticas primárias do cancro do fígado (Farazi & DePinho, 2006). Neste âmbito, o desenvolvimento deste carcinoma encontra-se associado a várias alterações moleculares que levam a uma desregulação de várias cascatas de sinalização, induzindo uma proliferação exagerada dos hepatócitos que sofreram mutações. Independentemente das vias de indução de HCC, mutações no gene supressor de tumor *TP53* ou alterações na sua expressão parecem ser consistentes em todos os casos (Farazi & DePinho, 2006).

Neste sentido, a análise molecular deste carcinoma demonstra várias modificações genéticas, como a presença de diversas alterações cromossomais, que levam a uma desregulação de vários oncogenes e genes supressores de tumor, incluindo *TP53*,  $\beta$ -catenina, membros da família dos receptores ErbB, E-caderina e ciclooxigenase 2 (*COX2*), entre outros (Forner, et al., 2012; Li, et al., 2012; Farazi & DePinho, 2006). Paralelamente a estas alterações genéticas decorrem, também, eventos epigenéticos que resultam em metilações de genes relevantes para o HCC humano (Farazi & DePinho, 2006), conduzindo ao silenciamento de genes supressores de tumores e à reactivação de oncogenes (Forner, et al., 2012). Neste âmbito, a metilação de ADN e a desregulação dos níveis de miRNAs são dois processos epigenéticos alterados durante a mutagénese dos hepatócitos (Zhao, et al., 2011). Por exemplo, com o desenvolvimento desta doença oncológica verifica-se o silenciamento do miR-26, o qual tem um papel de supressor de tumor em HCC (Zhao, et al., 2011; Kota, et al., 2009), como também se verifica uma sobreexpressão do miR-221 e do miR-21 que pode levar à proliferação deste carcinoma, assim como, facilitar a angiogénese e a invasão do tumor (Zhao, et al., 2011; Gramantieri, et al., 2008). A hipermetilação de promotores nas ilhas CpG, característica de vários tipos de cancro inclusive o HCC, pode conduzir também a uma proliferação exagerada das células tumorais, uma vez que estes promotores regulam alguns genes supressores de tumores e a hipermetilação pode levar a que haja silenciamento destes genes aquando da transcrição (Zhao, et al., 2011). Em suma, as várias alterações moleculares que ocorrem com o desenvolvimento desta patologia afectam as vias relacionadas com a sobrevivência e a proliferação celular, o que desencadeia uma proliferação exagerada dos hepatócitos alterados e conseqüentemente o crescimento tumoral.

Este carcinoma pode, também, desenvolver-se no seguimento de outras doenças hepáticas como as hepatites crónicas e a cirrose (Aravalli, et al., 2012), como se encontra exemplificado na Figura 1.



**Figura 1** - Desenvolvimento do hepatocarcinoma em resultado da presença de diferentes doenças hepáticas ou da presença de factores externos, nomeadamente aflatoxina B1 e o excesso de álcool. Adaptado de Farazi, P. et al., 2006.

### 1.1.1 **Epidemiologia e Etiologia**

O carcinoma hepatocelular (HCC) é considerado o sexto tipo de cancro com maior prevalência a nível mundial, correspondendo à terceira causa de morte relacionada com doenças cancerígenas (Forner, et al., 2012). O aparecimento de novos casos corresponde a uma incidência de quinhentos mil a um milhão por ano, causando a morte de aproximadamente seiscentas mil pessoas por ano (Singhal, et al., 2012; Gomaa, et al., 2008).

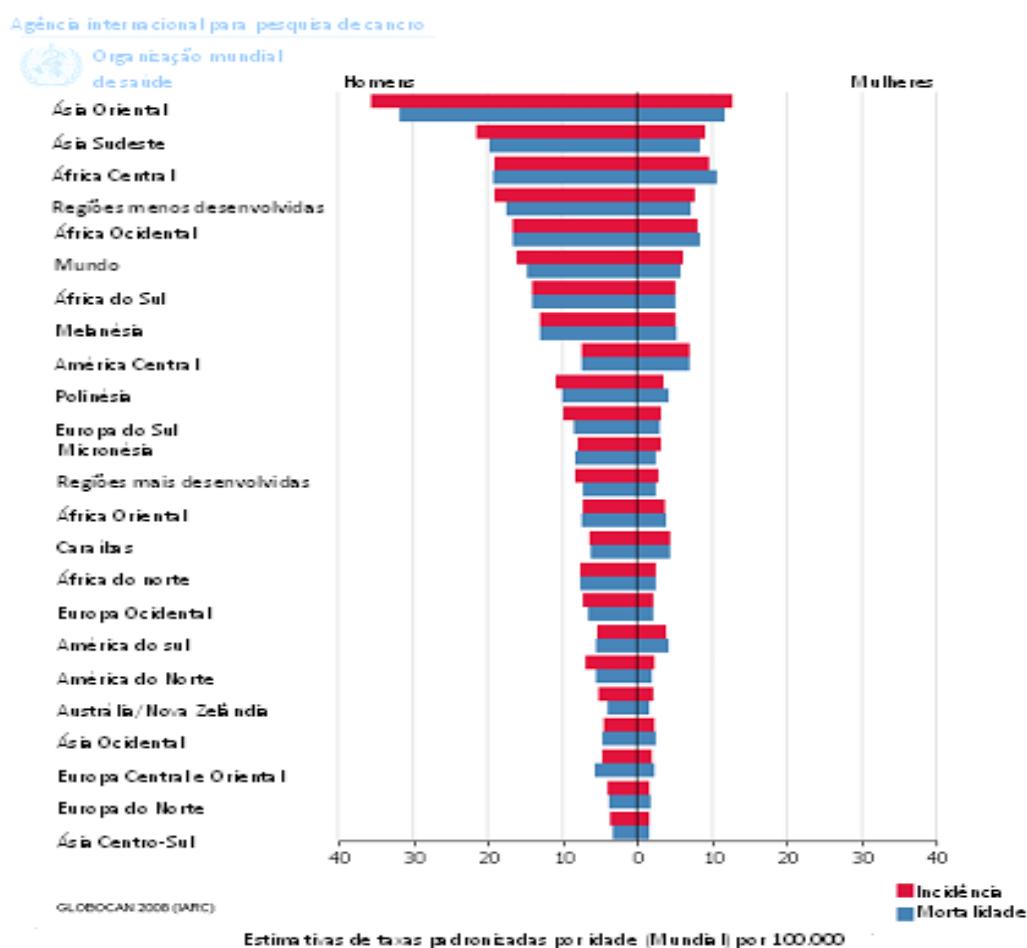
A maioria dos casos de HCC é relatada em países situados na Ásia, em que a incidência é elevada correspondendo a 20 casos/100000 pessoas. África é outra região que também apresenta uma grande incidência desta condição oncológica.

No entanto é de notar que nos últimos anos a taxa de pacientes com esta doença tem aumentado nos países Ocidentais, principalmente em Itália, Reino Unido, Canadá, Japão, Austrália e Estados Unidos da América (EUA) (Figura 2), tendo-se verificado, nos EUA, um aumento de 80% no aparecimento desta patologia nas últimas duas décadas (Gomaa, et al., 2008).

Neste sentido, o HCC afecta de uma forma geral a população mundial, no entanto esta incidência subdivide-se de acordo com a prevalência de factores etiológicos específicos. Esta doença afecta maioritariamente pessoas do género masculino (Farazi & DePinho, 2006), tal como se pode verificar pelos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Figura 2). Segundo o relatório da OMS para 2008 surgiram 749 000 novos casos de HCC, em que 70% destes correspondem a casos verificados em Homens e apenas 30% em mulheres (cancro,

2008). Este carcinoma é a terceira causa de morte em pessoas do sexo masculino e a quinta causa de morte em pessoas do sexo feminino (Gomaa, et al., 2008)

Para além do género, outros factores etiológicos que também influenciam a incidência desta doença são a idade e a raça/etnia. Com o aumento da idade aumenta, também, o aparecimento do HCC, atingindo a sua maior incidência numa idade igual ou superior a 65 anos. Nos EUA e Europa Ocidental é raro o desenvolvimento deste cancro antes dos 50 anos de idade (Gomaa, et al., 2008). Também, nos EUA é passível de se verificar diferenças entre pessoas com descendência distinta, uma vez que pessoas afro-americanas desenvolvem com maior frequência esta condição relativamente a pessoas americanas caucasianas, o que demonstra a influência da raça/etnia na incidência do HCC (Gomaa, et al., 2008).



**Figura 2** - Variação global do hepatocarcinoma. Dados para 2008 estimados pela GLOBOCAN (base de dados da agência internacional de investigação sobre cancro).

Outro factor/risco epidemiológico consiste nas infecções crónicas com o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da hepatite C (HCV), tendo já sido demonstrado que 50 a 80 % dos



casos de HCC a nível mundial são devidos ao HBV e 10 a 25 % são consequência do HCV (Venook, et al., 2010).

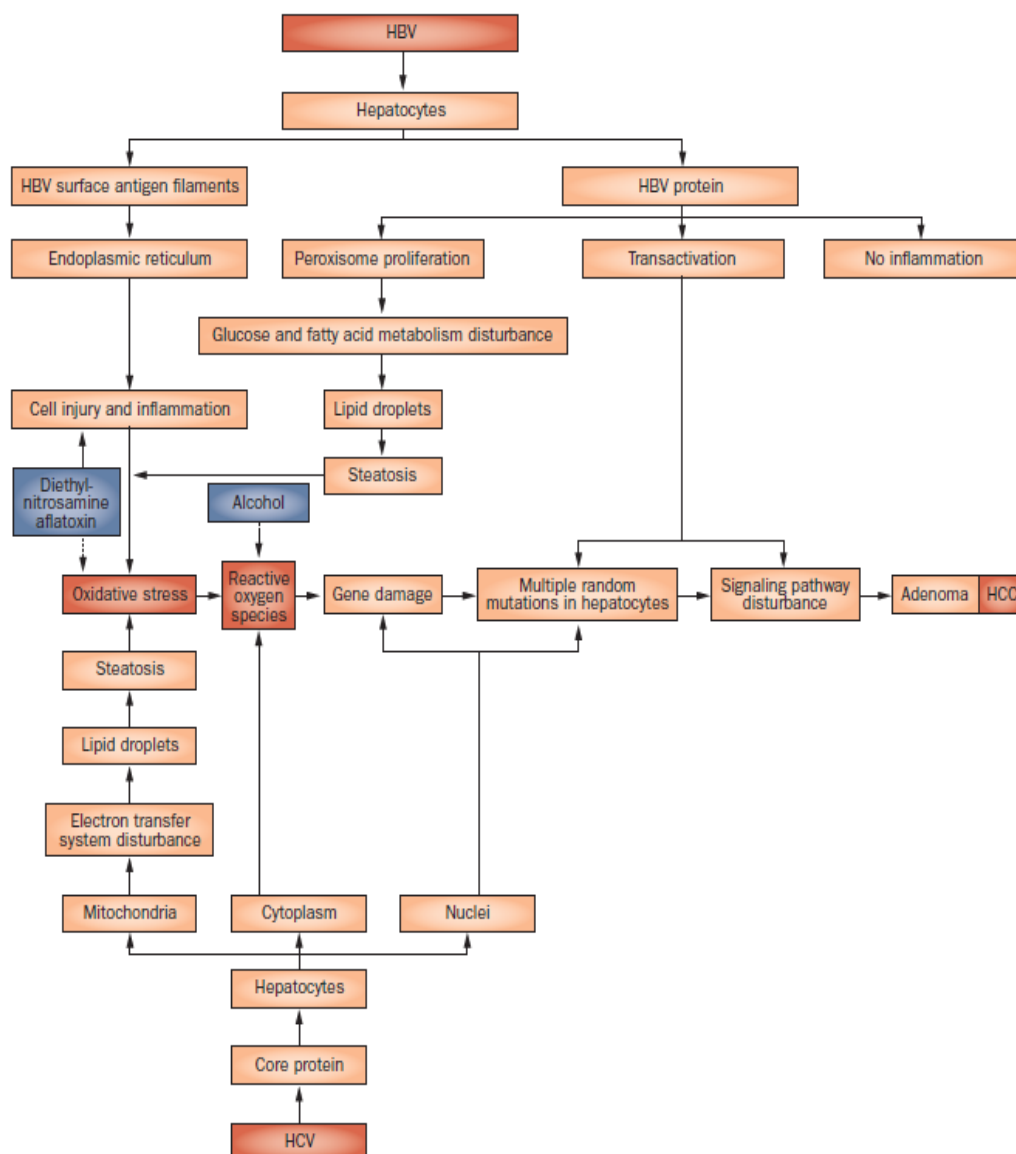
### **1.1.2 Factores de Risco**

O HCC pode surgir devido a vários factores, tais como factores genéticos, ambientais ou externos e virais. O desenvolvimento desta patologia, como consequência dos factores referidos, encontra-se exemplificado no esquema da Figura 3. O aparecimento deste carcinoma ocorre muitas vezes no seguimento de doenças hepáticas, sendo que os maiores factores de risco são os virais, como a hepatite B (HBV) e a hepatite C (HCV). Neste sentido, pessoas que padeçam de HBV ou HCV apresentam uma maior probabilidade de vir a desenvolver HCC, uma vez que estas condições virais provocam o aumento do stress oxidativo com consequente geração de espécies reactivas de oxigénio, o que leva a um ciclo vicioso de danos ao nível do material genético e da regeneração hepática (Li, et al., 2012).

Os factores externos apresentam apenas um papel secundário na indução do desenvolvimento do HCC. Estes correspondem normalmente ao consumo exagerado de álcool, que leva à cirrose hepática, e também ao consumo de aflatoxinas, toxinas presentes em vários alimentos, como o arroz (Li, et al., 2012).

Recentemente foram também reveladas pesquisas que mostram que tanto os diabetes tipo II como a obesidade são considerados, de forma independente, factores de risco para o desenvolvimento do hepatocarcinoma. Isto porque a resistência à insulina e a subsequente cascata inflamatória causada pelos diabetes tipo II e pela obesidade contribuem para o desenvolvimento de fígado gordo não-alcóolico, patologia que conduz ao desenvolvimento de doenças hepáticas crónicas, que por sua vez podem levar ao HCC (Zhao, et al., 2011; Paradis, et al., 2009).

Nos últimos anos também se tem vindo a realizar vários estudos demonstrando que, para além dos factores virais e secundários, os factores genéticos apresentam contribuições significativas para o desenvolvimento deste carcinoma. Como foi referido no ponto 1.1, anomalias cromossomais, como deleções e duplicações de genes, podem contribuir para uma maior susceptibilidade para este carcinoma.



**Figura 3** - Representação dos diversos factores e mecanismos que originam o hepatocarcinoma (HCC). As caixas vermelhas apresentam os principais factores, as caixas azuis mostram os factores secundários, as setas indicam os principais processos e as setas tracejadas indicam processos secundários. *Yan Li et al., 2012*

### 1.1.3 Tratamento

O HCC na maioria dos casos é apenas diagnosticado numa fase avançada da doença, designada por fase de metástase, uma vez que a fase inicial deste carcinoma é assintomática. Estes factos levam a que as opções de tratamento sejam limitadas e que a taxa de aplicação seja reduzida (Zhao, et al., 2011).

Neste sentido, ao longo dos anos foram estabelecidos vários sistemas de estágios clínicos para esta doença, de modo a que seja possível a determinação do prognóstico e do

tratamento que melhor se adequa ao estágio em questão (Zhao, et al., 2011). Actualmente, o sistema de estágios desenvolvido pelo grupo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) tem sido o mais utilizado e aceite na clinica, sendo também utilizado para vários testes clínicos de novos fármacos para tratar o HCC (Bruix & Sherman, 2011). De acordo com os critérios definidos pelo sistema de estágios clínicos do grupo BCLC, apenas 10 a 30% dos pacientes portadores de HCC são submetidos a intervenções cirúrgicas, sendo a maioria dos pacientes sujeitos a terapias alternativas, como intervenções percutâneas, intervenções transarteriais (Blum, 2005) e a cuidados paliativos.

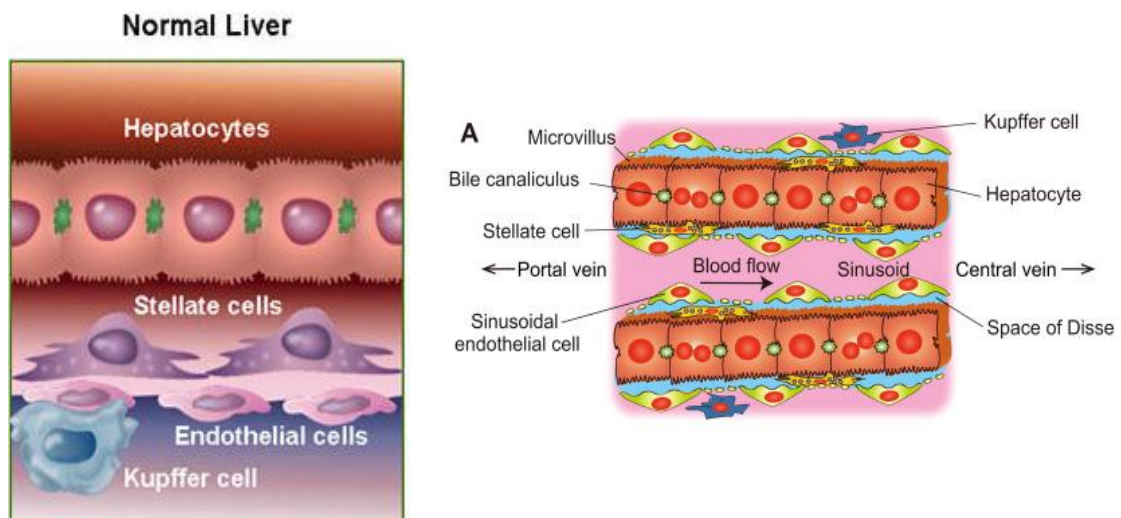
Apesar das intervenções cirúrgicas representarem a melhor opção de tratamento para esta doença, a taxa de aplicação é bastante reduzida devido às limitações existentes (Zhao, et al., 2011). As intervenções cirúrgicas subdividem-se em ressecção hepática e transplante de fígado, em que a primeira é limitada pelo tamanho do tumor, pela presença de lesões e pela disfunção do fígado em casos de pacientes com cirrose, e o segundo é limitado pela escassez de enxertos compatíveis (Zhao, et al., 2011).

As intervenções percutâneas consistem na melhor opção para pequenos tumores que não sejam passíveis de sofrerem ressecção hepática, sendo as principais opções de tratamento a injeção percutânea de etanol e a ablação termal por radiofrequência. A injeção percutânea de etanol consiste na injeção de etanol através da pele para o tecido danificado, neste caso o fígado, em que para isso se utiliza uma sonda guiada por um ultrassom ou por uma tomografia computadorizada. O etanol difunde-se, assim, nas células tumorais e provoca a desidratação e a desnaturação de proteínas, resultando em necrose coagulativa. Isto é seguido por trombose microvascular e isquemia tumoral subsequente (Ansari & Andersson, 2012; Blum, 2005). Por outro lado, a ablação por radiofrequência consiste na introdução de um eléctrodo no tecido danificado, o qual é guiado através de uma ultrassonografia ou de uma tomografia computadorizada. Assim que este eléctrodo se encontra dentro da lesão são induzidas correntes electromagnéticas de alta frequência, as quais causam agitação iónica e aumento da temperatura por fricção, levando a alterações celulares irreversíveis como desnaturação de proteínas e necrose coagulativa das células tumorais (Ansari & Andersson, 2012; Blum, 2005; Curley, 2001). Este aumento da temperatura no tecido alvo conduz, também, à destruição da sua microvascularização e ao desenvolvimento de trombose hepática arterial ou trombose das ramificações venosas hepáticas (Curley, 2001).

### 1.1.4 Hepatócitos

O fígado é o maior órgão humano ocupando 1/50 da massa corporal adulta. Este órgão é composto por vários tipos celulares que se dividem em células parenquimais (hepatócitos) e não parenquimais, sendo que os hepatócitos ocupam 78% do volume de tecido hepático (Ishibashi, et al., 2009).

O lóbulo hepático é a unidade estrutural e funcional do fígado, em que cada lóbulo é dividido por tecido conectivo. O lóbulo hepático é constituído essencialmente por hepatócitos, os quais consistem nas principais células do fígado, por células de Kupffer, as quais correspondem a macrófagos especializados estando envolvidas na reciclagem de glóbulos vermelhos velhos, e também por sinusoides, que são pequenas veias sanguíneas responsáveis pela recepção de sangue rico em oxigénio e nutrientes, os quais vão difundir para as células hepáticas (Figura 4). Os hepatócitos distribuem-se no lóbulo hepático de forma irregular formando camadas finas que irradiam a partir da veia central para a periferia do lóbulo. Estas células consistem nas células parenquimais do fígado e apresentam um importante papel no metabolismo de certos fármacos, na destoxificação do sangue e na secreção de proteínas do plasma (Yamadaa, et al., 2012)



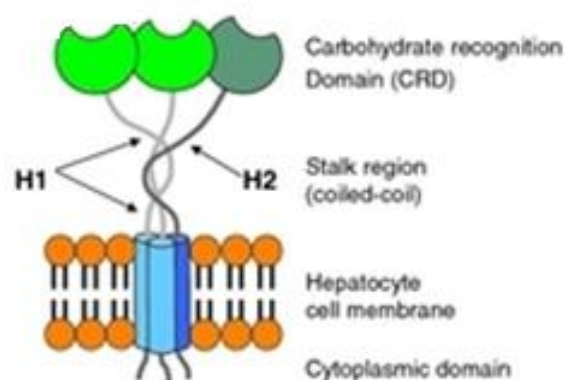
**Figura 4** - Ilustração da composição do lóbulo hepático. A unidade estrutural e funcional do fígado. Adaptado de Yamadaa, M., et al., 2012.

### 1.1.5 Receptor de Asialoglicoproteína

O receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) é uma proteína integral da membrana, especificamente expressa nos hepatócitos, em que a sua principal função consiste em reconhecer, capturar e subsequentemente promover a endocitose de glicoproteínas com resíduos de galactose ou N-acetilgalactosamina no terminal do glicano, de forma a manter a homeostase glicoproteica do soro (Ueno, et al., 2011) (Khorev, et al., 2008). Este receptor distribui-se de forma polarizada, localizando-se na zona basolateral do hepatócito, a qual corresponde à face vascular desta célula, para assim remover e degradar glicoproteínas prejudiciais (Ueno, et al., 2011).

Este receptor é caracterizado por duas subunidades homólogas designadas, em humanos, por H1 e H2, as quais formam um complexo heteroligomérico não covalente (Sorensen, et al., 2012; Spiess & Lodish, 1985; Breitfeld, et al., 1985; McPhaul & Berg, 1986). Estas subunidades consistem em proteínas transmembranares do tipo II com um domínio extracelular de grande dimensão, no terminal C, que contém uma região de reconhecimento de hidratos de carbono (“Carbohydrate recognition domain-CRD”) e uma região “stalk” (Sorensen, et al., 2012; Chiacchia & Drickamer, 1984; Spiess, 1990). Neste sentido, a especificidade deste receptor para hidratos de carbono deve-se ao domínio CRD, o qual pertence à família das lectinas do tipo C (Sorensen, et al., 2012; Weis & Drickamer, 1996).

Na Figura 5 encontra-se a ilustração da estrutura molecular deste receptor com os diferentes domínios diferenciados.



**Figura 5** - Estrutura molecular do receptor de asialoglicoproteína. Adaptado de *Springer Images*

Vários ensaios de ligação competitiva foram realizados ao longo dos anos com glicoproteínas e glicopeptídeos com terminais de oligossacarídeos bem definidos, assim como,

mono- e dissacarídeos, para demonstrar o acesso dos hidratos de carbono a este receptor. Na mesma ordem de ideias foram também realizados estudos que demonstraram que estes receptores se ligam de forma específica a glicoproteínas, que apresentem nos seus terminais resíduos de galactose e de N-acetilgalactosamina e que não possuam resíduos de ácido siálico (Sorensen, et al., 2012), sendo um exemplo de uma destas proteínas a asialofetuína.

A asialofetuína (ASF) consiste numa glicoproteína que deriva da fetuína, por perda dos terminais de ácido N-neuramínico da fetuína, ficando nos seus terminais com resíduos de galactose, o que leva a que esta seja reconhecida de forma específica pelos ASGP-Rs, tornando-se, conseqüentemente, num ligando eficiente (Wu, et al., 1998).

No caso do hepatocarcinoma, os hepatócitos sofrem variadas alterações genéticas e moleculares que levam ao desenvolvimento desta patologia, sendo que uma das alterações ocorre ao nível do número e distribuição do ASGP-R. Assim, em hepatócitos cancerígenos existe uma sobreexpressão do ASGP-R e uma perda da sua distribuição polarizada, encontrando-se em grande quantidade ao longo de toda a membrana e no citoplasma das células (Geffen & Spiess, 1992).

Neste sentido, este receptor torna-se um importante alvo de estudo para o desenvolvimento de sistemas de transporte de material genético e/ou fármacos, que tenham a capacidade de promover uma entrega específica e eficiente das moléculas terapêuticas às células do hepatocarcinoma.

## **1.2 Terapia Génica**

Nos últimos anos a procura de novas estratégias terapêuticas para contrariar os efeitos adversos dos tratamentos convencionais, principalmente ao nível de doenças cancerígenas, levou à utilização de genes como fármacos, através de processos biotecnológicos, como a tecnologia do DNA recombinante (Brown, s.d.; Park, et al., 2012).

Neste sentido, a terapia génica é uma das terapias desenvolvidas ao longo dos anos, em que no seu sentido amplo tem como objectivo a utilização de material genético para prevenir ou tratar doenças monogénicas e deficiências genéticas adquiridas, através da utilização de vectores como sistemas de transporte para a introdução do material genético exógeno nas células alvo (Park, et al., 2012; Edelstein, et al., 2007; Sheridan, 2011).

O sucesso desta terapia depende da entrega bem-sucedida e eficiente do material genético às células alvo, sendo esta eficiência dependente das características físico-químicas dos vectores utilizados.

### **1.2.1 Vertentes da Terapia Génica**

A terapia génica apresenta várias vertentes e a escolha da utilização de uma em detrimento das outras depende do tipo de patologia em causa, ou seja, esta modalidade terapêutica, consoante a doença, pode ser aplicada através da introdução de genes funcionais, de genes terapêuticos, de genes ‘marcadores’ ou por inibição específica da expressão dos genes com mutações.

Assim, a introdução de genes funcionais consiste na entrega de genes que estejam ausentes ou danificados, por meio de sistemas de transporte específicos, nas células com a referida mutação, podendo ser ou não integrados no genoma alvo. Conforme o tipo de patologia em que se poderá aplicar esta vertente, varia também a significância da necessidade de efectuar a integração do gene transportado no genoma alvo. Esta integração permite que haja transmissão da informação genética às células descendentes, resultando na expressão permanente do gene, enquanto a ausência de integração permite que apenas algumas células recebam o gene funcional. No entanto esta vertente é maioritariamente utilizada para tratar doenças monogénicas, em que para isso a integração no genoma é relevante, uma vez que se tratam de doenças que necessitam de tratamento a longo prazo.

Relativamente à introdução de genes ‘marcadores’, esta modalidade da terapia génica tem como principio a entrega de genes repórteres nas células alvo, através de um sistema de transporte específico, de forma a avaliar o sistema de transporte utilizado, em termos de

especificidade e eficiência de entrega de material genético nas células alvo e em termos de segurança.

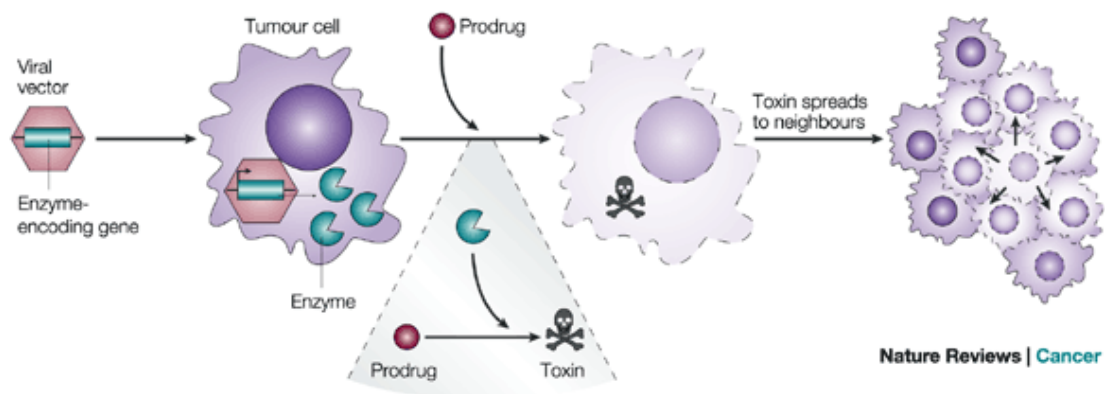
Outra das metodologias utilizadas em terapia génica consiste na inibição específica da expressão de genes associados à patologia. Para a aplicação desta vertente, consoante a patologia que se pretende tratar, pode entregar-se nas células alvo, por meio de um sistema de transporte, oligonucleótidos antisense, os quais podem actuar tanto ao nível da inibição da transcrição como ao nível da inibição da tradução do mRNA, ribozimas, as quais actuam mediando a clivagem do mRNA alvo (Dykxhoorn, et al., 2003), como também podem entregar nas células mutadas miRNAs ou siRNAs. Os miRNAs são pequenas moléculas não codificantes de RNA que podem regular os seus alvos de duas maneiras, dependendo do grau de complementaridade que exercem sobre o alvo. Assim, os miRNAs que se ligam com uma complementaridade praticamente perfeita a locais do mRNA alvo actuam promovendo a clivagem do mRNA transcrito, o que resulta na degradação do mesmo, enquanto os miRNAs que se ligam a locais do mRNA com complementaridade imperfeita actuam através da repressão da tradução do mRNA alvo (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Tong & Nemunaitis, 2008). Os siRNAs são pequenas moléculas de RNA de cadeia dupla, que uma vez no citoplasma interagem com proteínas citoplasmáticas com actividade catalítica (ribonucleases endógenas) formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), o qual utiliza os siRNAs para o guiar até ao mRNA alvo e assim clivar endonucleotidicamente o mesmo (Dykxhoorn, et al., 2003; Izquierdo, 2005)

Neste contexto, a utilização de genes terapêuticos consiste, também, numa metodologia para a aplicação da terapia génica, a qual tem vindo a ser a mais utilizada, a nível mundial, para o tratamento de doenças cancerígenas (Park, et al., 2012; El-Aneed, 2004; Guinn & Mulherkar, 2008). Os genes terapêuticos correspondem a genes que não se encontram no genoma das células alvo ou, caso aí existam, que não são expressos ou suficientemente expressos, e que são responsáveis pela expressão de proteínas farmacologicamente benéficas. Como exemplo da utilização destes genes encontra-se a terapia com genes suicidas.

A terapia de genes suicidas, inicialmente descrita como uma terapia anti-cancro, foi uma das primeiras aplicações clínicas da terapia génica (Morgan, 2012; Di Stasi, et al., 2011). Os estudos iniciais, referentes a esta terapia, envolveram a expressão de uma enzima heteróloga que podia metabolizar um pró-fármaco inactivo num derivado citotóxico, conduzindo à morte celular (Morgan, 2012; Natsume & Yoshida, 2008). Este derivado citotóxico podia, também, promover uma amplificação da morte celular, ou seja, podia não só levar à morte das células transfectadas mas também das células vizinhas não transfectadas, num fenómeno denominado “Efeito de Bystander”.



Uma das estratégias mais estudadas na aplicação desta vertente da terapia génica no cancro é a combinação do gene que codifica a timidina cinase do vírus herpes simplex (HSV-Tk) e o pró-fármaco Ganciclovir (GCV). A HSV-Tk tem grande afinidade pelo GCV, o que lhe permite catalisar a fosforilação do GCV para a sua forma monofosfatada, a qual é posteriormente convertida nos seus derivados di- e trifosfatados pelas cinases celulares. De seguida, a DNA polimerase incorpora o GCV-trifosfato na replicação do ADN, levando à morte celular por inibição da polimerase e indução da apoptose (Morgan, 2012; McCormick, 2001) (Figura 6).



**Figura 6** - Ilustração do mecanismo de actuação da estratégia de terapia génica com genes suicidas, HSV-Tk/GCV. McCormick, F., 2001.

Este sistema tem vindo a ser utilizado em vários estudos pré-clínicos em diversas patologias oncológicas, assim como, tumores cerebrais, em que os resultados obtidos têm vindo a ser bastante motivadores (Natsume & Yoshida, 2008).

### 1.2.2 Vectores em Terapia Génica

Como referido anteriormente, o sucesso da terapia génica depende em grande parte da entrega bem-sucedida do material genético às células alvo, sendo esta eficiência de entrega largamente dependente das características físico-químicas dos vectores utilizados (Faneca, et al., 2002; Pedroso de Lima, et al., 2001). Actualmente, os sistemas de transporte e entrega de material genético dividem-se em dois grandes grupos, os vectores do tipo viral e os do tipo não viral.

Os vectores virais são os que mais têm sido utilizados em ensaios clínicos devido, entre outras vantagens, tanto à sua elevada capacidade para realizar a entrega do material genético e efectuar a transdução das células alvo, como à sua capacidade, dependendo do tipo de vector viral, para promover uma expressão de longa duração, devido à integração do

transgene no genoma do hospedeiro (Park, et al., 2012). No entanto, estes vectores têm limitações de grande impacto, nomeadamente os problemas associadas à segurança de aplicação. Por exemplo, no caso dos vectores retrovirais, uma vez que a integração do material genético é feita ao acaso, sendo entregue aleatoriamente no genoma alvo, podem provocar mutagénese e carcinogénese (Paecharoenchai, et al., 2012) (Templeton, 2009). Apresentam também desvantagens ao nível do reconhecimento pelo sistema imunitário, visto que, por exemplo, o uso de vectores adenovirais pode desencadear reacções inflamatórias generalizadas (Brown, s.d.; Park, et al., 2012; Edelstein, et al., 2007; Mulligan, 1993).

Devido aos problemas de segurança de aplicação a que estes vectores estão associados, foi necessária a procura de estratégias alternativas para a entrega do material genético às células alvo. Neste sentido, os vectores não virais surgem como uma alternativa viável, tendo-se investigado vários sistemas de entrega e sendo, actualmente, os lipossomas catiónicos considerados os mais promissores (Faneca, et al., 2002; Simões, et al., 2005), na medida em que conseguem transportar grandes quantidades de material genético e induzir a sua libertação no citoplasma das células alvo, resultando numa actividade biológica significativa (Paecharoenchai, et al., 2012; Noguchi, et al., 1998; Xu & Szoka, 1996).

### **1.2.3 Complexos lipossoma catiónico/ADN**

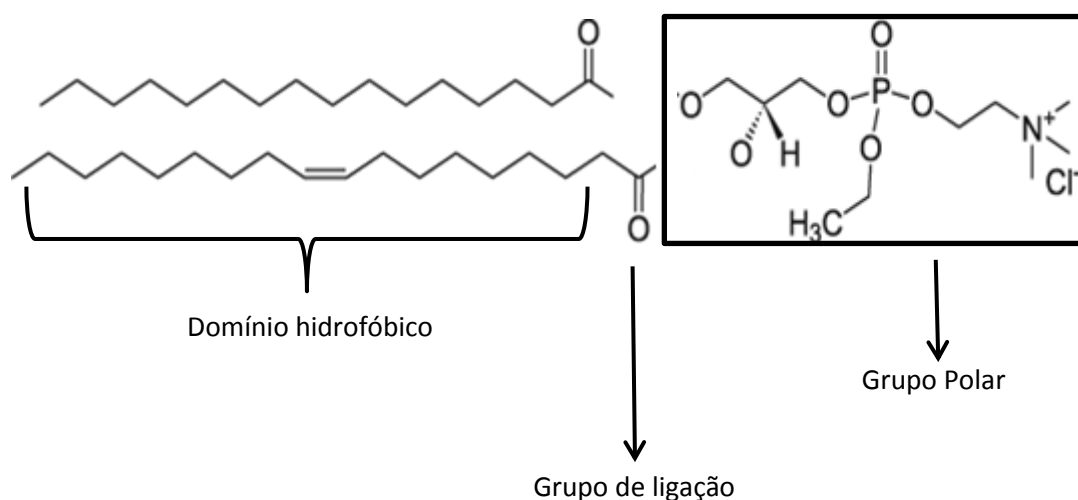
No sentido de ultrapassar as desvantagens dos vectores virais, os vectores não-virais têm vindo a ser desenvolvidos e utilizados como uma alternativa segura. Entre estes os lipossomas catiónicos têm ganho interesse ao longo do tempo, uma vez que apresentam capacidade para formar complexos com o material genético, transportando e protegendo o ADN, e, também, facilitando a sua entrada nas células alvo (Park, et al., 2012; Pack, et al., 2005; Morille, et al., 2008).

Assim, os lipossomas catiónicos utilizados nos complexos lipossoma catiónico/ADN (lipoplexos) são preparados em laboratório a partir de várias bases lipídicas, no sentido de testar qual a base mais eficiente na protecção e entrega do material genético às células alvo (Faneca, et al., 2002). A composição dos lipossomas é bastante importante uma vez que determina as características físico-químicas dos lipoplexos, bem como a sua actividade biológica, a sua estabilidade nos fluídos biológicos e a protecção do ADN (Simões, et al., 2005).

Neste âmbito, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de demonstrar quais as melhores bases lipídicas para a utilização destes sistemas de transporte e entrega de material genético em diferentes patologias. Além da composição lipídica, é de ressaltar a importância do controlo dos parâmetros envolvidos na formação dos lipoplexos, como a

ordem e rácio de adição dos componentes e o tempo e temperatura de maturação, visto que estes parâmetros também influenciam as características físico-químicas finais dos complexos (Faneca, et al., 2002) e conseqüentemente a sua capacidade de transfecção, uma vez que vários estudos demonstraram que complexos lipossoma catiónico/ADN preparados com um excesso de cargas positivas relativamente às negativas apresentam maiores taxas de transfecção.

A composição base da maior parte das formulações de lipossomas catiónicos consiste num lípido catiónico e num lípido neutro, sendo a interacção com o ADN resultante do estabelecimento de interacções electrostáticas entre a carga negativa do material genético e a carga positiva dos lipossomas catiónicos (Zhang, et al., 2012), a qual é conferida pelo lípido catiónico. Quando estas interacções electrostáticas são criadas o ADN é condensado e formam-se os complexos lipossoma catiónico/ADN (Simões, et al., 2005; Paecharoenchai, et al., 2012; Ram, 2005). Na Figura 7 encontra-se ilustrada a estrutura de um lípido catiónico através do exemplo do lípido catiónico 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC).



**Figura 7** - Estrutura química do lípido catiónico 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC), em que este é composto por um grupo hidrofóbico, um grupo polar e um grupo de ligação que une a parte hidrofóbica à parte polar.

Os lípidos catiónicos apresentam na sua estrutura um grupo polar carregado positivamente, o qual, por meio de um grupo de ligação, liga-se a um domínio hidrofóbico. Cada um destes componentes apresenta características específicas que influenciam o comportamento do lípido catiónico nos complexos lipossomas catiónicos/ADN, afectando, conseqüentemente, o desempenho dos lipoplexos (Simões, et al., 2005).

O grupo polar pode ser composto por um ou mais grupos amina, no entanto quando é composto por múltiplos grupos amina apresenta uma maior eficiência na condensação do ADN e é mais activo que o formado por um simples grupo amina. Contudo, estes lípidos catiónicos com múltiplos grupos amina têm uma maior predisposição para formar micelas, o que pode levar a uma menor estabilidade e a uma maior toxicidade dos complexos. Ainda neste sentido, verifica-se que a orientação do grupo polar relativamente ao domínio hidrofóbico dos lípidos catiónicos é um aspecto importante, na medida em que afecta a actividade dos complexos (Simões, et al., 2005).

O domínio hidrofóbico presente na composição dos lípidos catiónicos é caracterizado por cadeias de ácidos gordos ou por colesterol. Quando o lípido catiónico tem na sua estrutura colesterol, este apresenta maior actividade em relação ao lípido catiónico composto por cadeias de ácidos gordos (Simões, et al., 2005).

Relativamente ao grupo de ligação que une o grupo polar ao domínio hidrofóbico do lípido catiónico, este encontra-se directamente relacionado com o grau de transfecção e com a citotoxicidade dos lípidos. Isto porque, estudos anteriores demonstraram que lípidos catiónicos que apresentem ligações estáveis de éter são mais citotóxicos em culturas celulares que os que apresentem ligações instáveis de éster, no entanto as ligações de éter apresentam maior resistência à hidrólise enzimática (Lila, et al., 2010; Leventis & Silvius, 1990; Khazanov, et al., 2006). Por exemplo o lípido catiónico 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC), devido à presença de ligações éster exhibe uma menor citotoxicidade para as células (Simões, et al., 2005; Faneca, et al., 2008; Faneca, et al., 2004).

Relativamente ao lípido neutro presente na constituição dos lipossomas catiónicos, este deve ser escolhido de forma cuidada, uma vez que estes podem afectar as propriedades dos lipossomas e, conseqüentemente, dos lipoplexos, podendo alterar de forma significativa a sua actividade biológica.

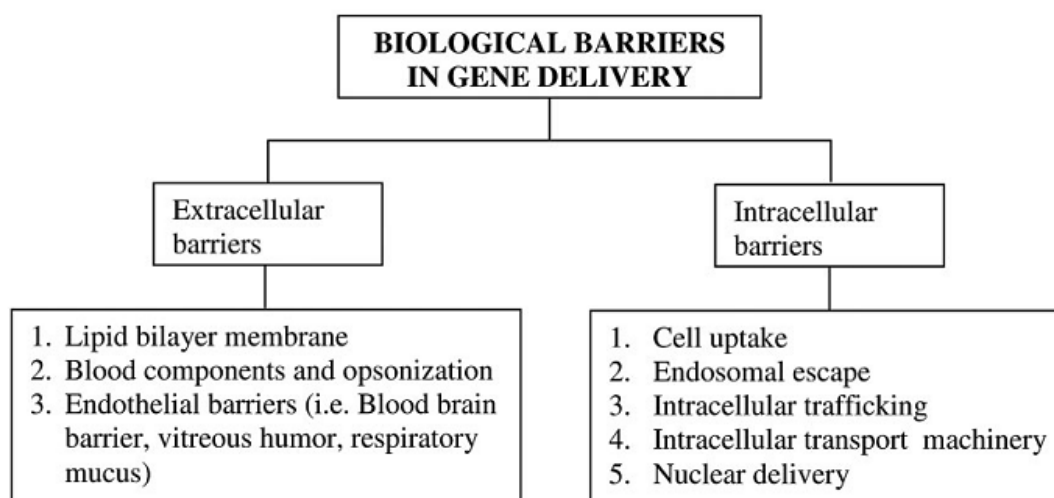
Diversos estudos têm demonstrado que a mistura equimolar de lípidos neutros com lípidos catiónicos, na preparação dos lipossomas catiónicos, é de grande importância, na medida em que esta associação promove geralmente um aumento da capacidade de transfecção relativamente aquela que é apresentada por lipossomas catiónicos compostos apenas por lípidos catiónicos (Simões, et al., 2005).

Neste sentido torna-se crucial a escolha adequada do lípido catiónico e do lípido auxiliar que se pretende utilizar. Sendo que deste modo, o lípido catiónico 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC) e o lípido auxiliar colesterol têm vindo a ser bastante utilizados para o desenvolvimento de formulações de lipossomas catiónicos como sistemas de entrega de material genético, uma vez que estudos anteriores demonstraram que lipoplexos

contendo EPOPC apresentam elevada actividade biológica e exibem uma menor toxicidade para as células, devido à presença das ligações éster na ligação do grupo polar com o domínio hidrofóbico do fosfolípido (Simões, et al., 2005; Faneca, et al., 2004). Relativamente ao colesterol, este promove uma compactação e estabilização da bicamada lipídica dos lipossomas catiónicos na presença de soro, resultando num aumento da actividade biológica dos lipoplexos (Faneca, et al., 2008; Faneca, et al., 2004). Portanto, segundo a literatura, formulações de lipossomas catiónicos com EPOPC e colesterol, preparados numa razão molar (1:1), consistem num sistema de transporte e entrega de material genético bastante eficiente, resultando em lipoplexos com uma elevada capacidade de transfecção (Simões, et al., 2005).

### 1.2.4 Barreiras à entrega de material genético

A entrega de material genético directamente nas células alvo pode ser impedida por diversas barreiras biológicas, como sejam: a presença de nucleases nos fluídos biológicos, que rapidamente degradam o material genético; a interacção com as barreiras endoteliais e com as proteínas do soro; a dificuldade do material genético em atingir o tecido alvo; e a ligação e internalização dos ácidos nucleicos pelas células alvo, assim como a sua saída da via endocítica e entrada no núcleo (Figura 8) (Pathak, et al., 2009; Simões, et al., 2005; Faneca, et al., 2004). A presença destas barreiras reduz drasticamente a eficiência de entrega do material genético e, consequentemente, a actividade biológica dos lipoplexos. Neste sentido, torna-se necessário desenvolver estratégias que permitam ultrapassar estas barreiras e assim obter uma entrega específica e eficiente de material genético às células alvo.



**Figura 8** - Representação esquemática das barreiras biológicas associadas à entrega do material genético. Pathak, A. et al., 2009.

#### **1.2.4.1 Barreiras extracelulares**

A entrega de material genético *in vivo*, por via de sistemas de transporte especializados como os lipossomas catiónicos, apresenta várias limitações, as quais levam a que os resultados obtidos *in vitro* não sejam reproduzíveis integralmente. Estas limitações devem-se às barreiras que os lipoplexos têm que atravessar até atingir o tecido alvo, as quais diminuem drasticamente a capacidade de transfecção destes vectores. Desta forma, um dos maiores obstáculos ao uso de lipoplexos *in vivo* consiste na entrega eficiente e específica do material genético no tecido alvo (Wu, et al., 2011).

As proteínas presentes no soro, incluindo as nucleases, constituem uma das principais barreiras para aplicação da terapia génica *in vivo*. Ou seja, as proteínas presentes no soro apresentam uma carga superficial negativa, podendo interagir/ligar de forma inespecífica aos lipoplexos com carga superficial positiva e, conseqüentemente, promover a remoção dos lipoplexos da circulação sanguínea através do sistema reticulo-endotelial (Resina, et al., 2009). As proteínas do soro podem também interagir com os lipoplexos levando à alteração da sua estrutura, conduzindo à agregação/desestabilização dos mesmos, o que pode aumentar a exposição do seu material genético à acção das nucleases, conseqüentemente, promovendo a degradação dos ácidos nucleicos dos lipoplexos (Resina, et al., 2009).

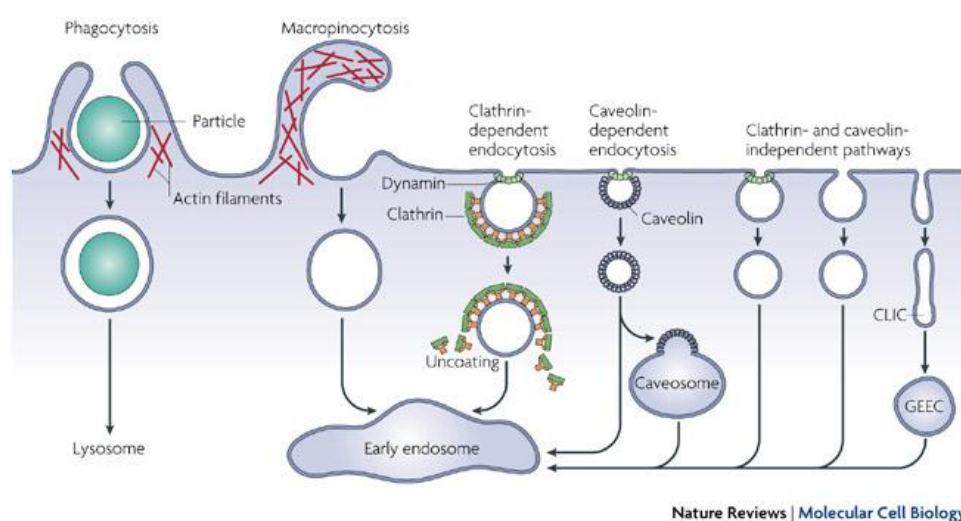
O mecanismo de ligação às células alvo é outra das barreiras extracelulares que os lipoplexos necessitam de ultrapassar, sendo que, na ausência de um ligando, este mecanismo é determinado essencialmente pelas propriedades físico-químicas dos lipoplexos, nomeadamente o tamanho e a carga superficial. Ou seja, na ausência de um ligando ocorre uma interacção iónica não específica entre a carga superficial positiva dos lipoplexos e a carga superficial negativa da membrana celular, o que leva a que os lipoplexos se liguem à membrana citoplasmática, permitindo assim a entrada dos mesmos nas células alvo (Zhang, et al., 2012).

#### **1.2.4.2 Barreiras intracelulares**

A internalização dos lipoplexos pelas células alvo e a conseqüente entrega do material genético no núcleo dessas células para ser transcrito é um dos principais problemas existentes na aplicação da terapia génica. Este problema é representado por três barreiras, as quais os lipoplexos têm que enfrentar para conseguirem efectuar a entrega do material genético no núcleo das células alvo: a internalização celular dos lipoplexos, a libertação da via endocítica e

o transporte citoplasmático e entrada do material genético no núcleo.

Assim, o primeiro processo consiste no mecanismo de internalização dos lipoplexos pela célula alvo, em que a principal via de internalização é a via endocítica, sendo, consequentemente, em grande parte responsável pela eficiência de transfecção dos mesmos (Resina, et al., 2009; Zhang, et al., 2012). A endocitose pode ser dividida em dois tipos de mecanismos: a fagocitose, mecanismo que apenas ocorre em células especializadas como os macrófagos; e a pinocitose, mecanismo que acontece em todos os tipos de células (Figura 9) (Conner & Schmid, 2003; Parton & Simons, 2007).



**Figura 9** – Representação esquemática das diferentes vias de entrada nas células. Adaptado de *Parton, R. G. et al., 2007*.

Assim, a fagocitose consiste num processo activo, que envolve a presença de receptores especializados na superfície da membrana celular e cascatas de sinalização, uma vez que este processo é realizado por células especializadas, em que a sua função consiste em fagocitar agentes patogénicos de grandes dimensões (Lopez & Arias, 2010). A pinocitose envolve a incorporação, principalmente, de solutos e água. Esta via endocítica compreende várias vias, nomeadamente macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina.

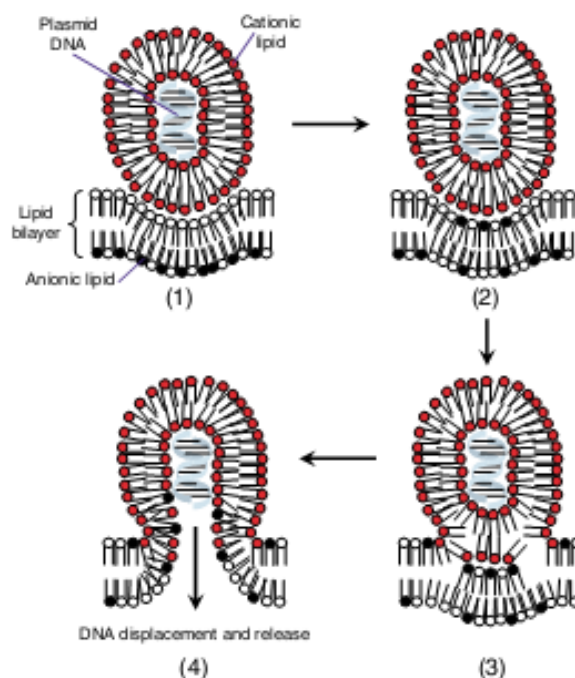
Como foi mencionado anteriormente, as propriedades físico-químicas dos lipoplexos influenciam a sua ligação e internalização celular e, na ausência de um ligando, determinam completamente o curso da sua internalização pelas células alvo. Neste âmbito, no caso dos complexos carregados positivamente, estabelecem-se interações electrostáticas entre a carga positiva dos lipoplexos e a carga negativa da membrana celular que resultam na ligação dos complexos às células e na sua internalização por via endocítica. Relativamente à contribuição

do tamanho dos complexos, segundo a literatura, partículas com tamanhos compreendidos entre 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  (Zhang, et al., 2012) entram nas células por macropinocitose, enquanto partículas de tamanho inferior a 250 nm podem entrar nas células por endocitose mediada por clatrina, e partículas maiores do que 500 nm entram preferencialmente por endocitose mediada por caveolina (Resina, et al., 2009). No entanto lipoplexos que apresentem na sua constituição algum ligando que seja reconhecido de forma específica por receptores presentes na membrana das células, podem entrar na célula por endocitose mediada por clatrina (Zhang, et al., 2012).

A segunda etapa na interação do material genético com as células alvo corresponde ao mecanismo de libertação dos lipoplexos do endossoma para o citoplasma. A ocorrência deste mecanismo de forma eficiente é de extrema importância para que não ocorra degradação do material genético ao nível do lisossoma. O mecanismo pelo qual os lipoplexos induzem a destabilização do endossoma promovendo a sua libertação para o citoplasma ainda não está completamente esclarecido. Contudo, é sugerido e aceite o modelo “flip-flop”, este modelo consiste na indução do “flip-flop” dos lípidos aniónicos do folheto citoplasmático para o folheto luminal da membrana do endossoma, levando à subsequente formação de pares de iões neutros entre os lípidos catiónicos dos lipoplexos e os lípidos aniónicos do endossoma, a qual promove a deslocação do ADN a partir dos lipoplexos, conduzindo à libertação do mesmo para o citoplasma (Figura 10) (Simões, et al., 2005; Zhang, et al., 2012; Medina-Kauwe, et al., 2005). Para além deste mecanismo, a libertação do material genético da via endocítica pode também ser auxiliada por determinados componentes dos complexos, como é o caso de algumas proteínas, nomeadamente a albumina.

Após a saída dos lipoplexos do endossoma, o material genético libertado para o citoplasma tem que migrar para o núcleo no intuito de ser transcrito, sendo a passagem através da membrana nuclear o processo final da internalização. Neste contexto, são propostos dois mecanismos para explicar a entrada de ADN no núcleo. O primeiro defende que durante a divisão celular a membrana é temporariamente desintegrada, e o ADN tira partido deste facto para entrar no núcleo e ser transcrito, o segundo corresponde ao mecanismo de transporte de ADN através dos poros nucleares (Elouahabi & Ruyschaert, 2005), pelo qual o material genético pode entrar na célula na ausência de divisão celular. É importante referir que estes dois mecanismos não são mutuamente exclusivos num dado tipo de célula (Elouahabi & Ruyschaert, 2005).





**Figura 10** – Exemplificação do mecanismo de flip-flop e endocitose dos lipoplexos. (1) O lipoplexos começa a ser endocitado. (2) Destabilização da membrana, indução do “flipping” dos lípidos aniônicos do folheto citoplasmático para o folheto luminal. (3) Os lípidos aniônicos e os lípidos catiônicos do lipoplexos formam pares de íons de carga neutra. (4) Deslocação do ADN e libertação para o citoplasma. Adaptado de *Medina-Kauwe et al., 2005*.

### 1.3 Terapia Génica aplicada ao Hepatocarcinoma

O carcinoma hepatocelular (HCC), como foi referido anteriormente, leva à morte de um elevado número de pessoas todos os anos, uma vez que as opções de tratamento disponíveis apresentam várias limitações. Neste sentido, tem-se tornado muito importante a procura e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar esta condição oncológica (Sangro, et al., 2010).

A terapia génica surge, assim, como uma estratégia promissora para o tratamento do HCC, recebendo bastante atenção por parte de vários grupos de investigação em todo o mundo. Uma das terapias que tem tido maior relevância para a aplicação em HCC consiste na aplicação da terapia de genes suicidas, com recurso por exemplo à utilização do sistema HSV-tk/GCV, uma vez que este se encontra já bem definido (Sangro, et al., 2010).

Kaneko e colaboradores determinaram que na maioria dos pacientes com hepatocarcinoma se verificavam níveis elevados da glicoproteína  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), em que estes níveis elevados eram regulados pela região adjacente à região terminal-5' (5'-flanking) do gene que codifica para a AFP. Com base nesta informação utilizaram esta sequência

(5'flanking) como promotor para o uso do Herpes Simplex Virus-timidina cinase (HSV-tK) mediado por um vector adenoviral, tendo verificado que a eficácia terapêutica desta estratégia seguida da aplicação do pró-fármaco ganciclovir (GCV) levava à morte das células que produziam elevados níveis desta proteína (células tumorais), enquanto que nas células que não produziam esta proteína não se verificou morte. Desta forma, este grupo de investigação desenvolveu uma forma específica para matar apenas as células deste carcinoma (Kaneko, et al., 1995).

Por outro lado, a vascularização tumoral também tem vindo a ser alvo de estudos, através, por exemplo, do desenvolvimento de sistemas terapêuticos para o transporte e entrega de material genético ou fármacos para estas células (Lila, et al., 2010). Isto é justificado pelo facto da vascularização tumoral ser responsável pelo transporte de nutrientes e oxigénio necessários para a proliferação das células tumorais, o que poderá levar a que seja vantajoso ter como alvo a vascularização tumoral relativamente às células tumorais (Lila, et al., 2010).

## 1.4 Objectivos

O hepatocarcinoma corresponde ao terceiro tipo de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial, sendo as opções de tratamento bastante limitadas. Neste sentido, é urgente desenvolver novas estratégias antitumorais que promovam uma acção terapêutica elevada e com efeitos secundários reduzidos, tendo a área da genómica e dos mecanismos moleculares vindo a receber especial atenção por parte de investigadores. Desta forma, os avanços da terapia génica têm-se mostrado promissores para o tratamento desta patologia, no entanto, a aplicação clínica desta terapia ainda apresenta limitações, uma vez que a eficiência de entrega do material genético nas células alvo é reduzida devido às barreiras biológicas presentes em aplicações *in vivo*.

Neste contexto, com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma nova formulação de lipossomas catiónicos para a entrega eficiente e específica de material genético às células do hepatocarcinoma. Com base neste propósito, desenvolveu-se uma nova formulação de lipossomas catiónicos, EPOPC:Chol:lactosyl-PE, a qual apresenta na sua constituição um lípido com resíduos de galactose. Neste sentido, avaliou-se a eficiência e especificidade desta formulação para entrega de material genético a este carcinoma, tendo-se comparado a sua eficácia com outros sistemas de transporte já desenvolvidos. Estudou-se também possíveis mecanismos envolvidos na actividade biológica deste sistema de transporte e analisaram-se as suas características físico-químicas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1 Cultura Celular

A linha celular humana de hepatoma, HepG2, foi obtida pela primeira vez a partir de tecido hepático de um paciente de 15 anos de idade com hepatocelular carcinoma (HCC) diferenciado. A morfologia desta linha celular é semelhante à das células epiteliais, libertando uma grande quantidade de proteínas plasmáticas, entre as quais a albumina e a transferina. Estas células sobreexpressam na sua superfície o receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R), o qual surge como um bom modelo de estudo do HCC.

A linha celular HepG2 foi mantida em cultura em DMEM-HG (“Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose”) (Sigma). Este meio foi suplementado com 10 mM de HEPES, 12 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (FBS) e também 100 unidades/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. A cultura das células foi feita em DMEM-HG e mantida numa incubadora a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Estas células foram diluídas em meio de cultura no mínimo duas vezes por semana, uma vez que atingiam rapidamente o estado de confluência. Para a diluição das células, o meio de cultura foi aspirado seguido de uma lavagem com 4mL de meio de dissociação, no intuito de remover completamente o meio de cultura. Após este passo, as células foram colocadas a incubar com 4mL de tripsina durante 5 minutos, permitindo o destacamento das mesmas do frasco.

No sentido de inibir o efeito da tripsina foi adicionado 6 mL de meio de cultura, e a suspensão celular foi homogeneizada para dissolver os agregados celulares. A diluição para fazer as subculturas foi aproximadamente 1:3 e 1:4. Para as subculturas em novos frascos foi adicionado meio de cultura até perfazer 20mL de volume.

## 2.2 Preparação dos lipossomas catiónicos

Os lipossomas catiónicos unilamelares (SUV) foram preparados por extrusão de lipossomas multilamelares (MLV) compostos por (razão molar 1:1) misturas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC) e colesterol (Chol) (Avanti Polar Lipids) e EPOPC:Chol com 15% de lactosil-fosfatidiletanolamina (lactosil-PE) (Avanti Polar Lipids). Inicialmente foram lavados tubos de vidro com clorofórmio a fim de remover todo o lixo residual. De seguida adicionou-se a cada tubo de vidro o volume apropriado de EPOPC e Chol, como também, o volume apropriado de lactosil-PE para atingir a concentração de 15%. Estes lípidos foram retirados da sua solução *stock* preparada em clorofórmio e armazenada a – 20°C.

Após misturar os lípidos para a razão molar desejada, estes foram secos sob vácuo

num evaporador rotativo, eliminando todos os vestígios de clorofórmio e permitindo a formação de um filme lipídico no fundo de cada tubo de vidro. O filme lipídico seco foi, depois, hidratado com 1mL de água MiliQ e submetido a uma homogeneização por vórtex, promovendo a hidratação do mesmo com obtenção de MLVs. Os MLVs foram sonicados durante 3 minutos e extrusados 21 vezes. A extrusão de cada formulação foi realizada usando um Liposofast device (Avestin, Toronto, Canada) (Faneca, et al., 2008; Faneca, et al., 2004), através de dois filtros de policarbonato com poros de diâmetro de 50nm. Na sequência da extrusão, as suspensões homogêneas de SUVs obtidas foram diluídas três vezes com água MiliQ e esterilizadas com filtros de acetato de celulose com poros de diâmetro de 0.22 µm (Firilabo) (Faneca, et al., 2008; Faneca, et al., 2004). Os lipossomas foram armazenados a 4°C até futura utilização.

No caso de estudos de ligação e internalização, foram preparadas diferentes formulações de lipossomas catiónicos com 1% de rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamine (rodamine-PE) (Faneca, et al., 2008). Assim, a primeira formulação consistiu em 50% EPOPC, 50% Chol e 1% rodamina-PE, enquanto a segunda formulação era composta por 50% EPOPC, 50% Chol, 15% lactosil-PE e 1% rodamina-PE. Estes lipossomas foram preparados de acordo com o protocolo descrito anteriormente com uma precaução adicional, uma vez que foram preparados protegidos da luz.

### **2.3 Determinação da concentração lipídica**

A extrusão, com o intuito de formar lipossomas catiónicos unilamelares (SUV), é um processo onde a perda lipídica é inevitável e por isso a concentração lipídica final é diferente quando comparada com a inicial. Neste sentido torna-se necessário quantificar o teor lipídico no final da preparação dos lipossomas catiónicos. Neste trabalho escolheu-se a quantificação do teor de colesterol (Chol), uma vez que se trata de um método simples e eficiente. Os lipossomas foram preparados a uma razão molar de 1:1, o que significa que a concentração de EPOPC é igual à concentração de Chol, sendo que a concentração de EPOPC também fornece a concentração de cargas positivas. Isto resulta do facto de que uma molécula de EPOPC tem uma carga positiva, enquanto que a molécula de Chol não tem carga.

A quantificação de Chol foi realizada pelo método de Liebermann-Burchard, o qual é um método colorimétrico. Para aplicar este método foi necessário a preparação de um reagente específico, o qual consiste em adicionar ácido anídrico a ácido acético glacial seguido da adição de ácido sulfúrico. No sentido desta mistura continuar estável foi adicionado

também sulfato de sódio. A preparação deste reagente deve ser realizada na *hotte* e o recipiente com os ácidos deve estar em gelo, visto a reação entre estes ácidos ser bastante exotérmica. Após a preparação, o reagente de colesterol foi armazenado num frasco de vidro a 4°C.

A quantificação do Chol foi feita numa placa de 96 poços e em cada poço adicionou-se 6 µL de uma amostra de cada formulação de lipossomas catiónicos preparadas anteriormente. A curva de calibração foi efectuada pela adição em cada poço de 6 µL de soluções com concentrações conhecidas de colesterol (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1mg/mL). Assim, em cada poço tanto com amostras das formulações de lipossomas catiónicos ou amostras com diferentes concentrações de colesterol, em duplicados, foram adicionados 200 µL de reagente de colesterol. Seguido à adição do reagente, a placa foi a incubar a 37°C durante 20 minutos. Após a incubação, a absorvância foi lida a 625 nm num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Divices).

O reagente de colesterol reage com o grupo OH do colesterol tornando azul a mistura, sendo o azul mais intenso com o aumento da concentração de colesterol. Portanto existe uma relação linear entre a concentração de colesterol e a absorvância a 625 nm.

## **2.4 Preparação dos complexos lipossomas catiónicos/ADN**

Os lipoplexos foram preparados numa solução tampão salina com HEPES (HBS) (100 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7.4) a partir das suspensões de lipossomas, com concentrações conhecidas, e da solução de ADN, preparada em HBS, com uma concentração de 10 µg/mL. O volume de lipossomas foi utilizado de acordo com a concentração obtida pela quantificação do colesterol, e com a razão de carga desejada (+/-) entre os lipossomas catiónicos e o ADN.

Primeiramente, os lipossomas catiónicos foram adicionados a uma solução de HBS (100 µL/µg de DNA) e depois a mistura foi ligeiramente agitada. De seguida adicionou-se 100 µL de solução de HBS contendo 1 µg de pCMVluc codificando a luciferase (um presente do Dr. P. Felgner, Vical, São Diego, CA) ou 1 µg de pCMVgfp codificando a proteína verde fluorescente (Clontech, Mountain View, CA). Uma vez a solução de ADN adicionada, os lipoplexos (complexos lipossomas catiónicos/ADN) foram brevemente agitados e as misturas foram a incubar por 15 minutos à temperatura ambiente. Os lipoplexos foram utilizados imediatamente após a sua preparação. Os lipoplexos usados para estudos de transfecção



foram preparados com soluções estéreis e a sua produção foi executada numa câmara de fluxo.

## **2.5 Medição da carga superficial dos lipoplexos**

A carga superficial dos lipoplexos foi determinada através da análise da luz difratada. Esta análise mede a mobilidade electroforética e a distribuição do potencial zeta ( $\xi$ ), expresso em mV. Ou seja, consiste na aplicação de uma corrente eléctrica à suspensão dos complexos, em que o potencial zeta corresponde à diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula (*shear plane*) e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula, em que será determinada a carga superficial dos lipoplexos.

Os lipoplexos foram preparados com 5  $\mu\text{g}$  de ADN, de acordo com o protocolo descrito no ponto 2.4 dos Materiais e Métodos. Após a preparação dos lipoplexos, estes foram adicionados a uma célula e de seguida colocou-se esta célula no medidor de potencial zeta Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, UK).

## **2.6 Medição do diâmetro dos lipoplexos**

A medição do diâmetro dos lipoplexos foi avaliada usando um Coulter N4 Plus (Coulter Corporation, Miami, FL, USA), o qual consiste numa técnica de espectroscopia de correlação fotónica. Esta técnica utiliza o efeito da dispersão da luz para determinar as flutuações dependentes do tempo e resultantes do movimento Browniano das partículas em suspensão. A intensidade da interferência da luz num determinado ângulo fixo é detectada por um fotomultiplicador cuja corrente produzida passa por um sistema de autocorrelação, o qual analisa em função do tempo, determinando assim o índice de difusão e consequentemente o tamanho das partículas (Faneca, et al., 2002; Faneca, et al., 2004).

Os lipoplexos foram preparados com 4  $\mu\text{g}$  de ADN, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (ponto 2.4-Materiais e Métodos). Após a preparação dos lipoplexos, foi adicionado a uma cuvette de quartzo 2 mL de HBS e depois 400  $\mu\text{L}$  de lipoplexos com posterior homogeneização, isto para cada formulação de lipoplexos preparada. Por fim efectuou-se a medição do diâmetro das partículas.

## 2.7 Ensaio da intercalação do brometo de etídio

A protecção do ADN por parte dos lipoplexos foi avaliada através do nível de acessibilidade do brometo de etídio (EtBr) ao ADN. Os lipoplexos foram preparados com 1 µg de ADN, de acordo com o protocolo descrito no ponto 2.4 dos Materiais e Métodos.

Os lipoplexos correspondentes a 0,5 µg de ADN (100 µL) foram adicionados a uma placa de 96 poços e de seguida foram, também, adicionados 100 µL de uma solução de EtBr com uma concentração de 800 nM.

Esta mistura foi, depois, a incubar e após a incubação a acessibilidade do EtBr ao ADN foi avaliada com acesso a um fluorímetro SPECTRAmax GEMINI EM (Molecular Devices). A fluorescência do EtBr foi lida a um comprimento de onda de excitação e de emissão de 518 e 605 nm, respectivamente.

A molécula de EtBr é um intercalador do ADN que se liga à dupla cadeia de ADN. Esta molécula apresenta uma fluorescência residual e essa fluorescência aumenta com o nível de intercalação no ADN. Assim, através deste ensaio é possível avaliar o nível de exposição do material genético nos lipoplexos.

A fluorescência residual do EtBr foi obtida usando 100 µL de HBS e 100 µL de EtBr e a fluorescência máxima foi observada usando uma condição controlo, a qual consistiu numa mistura de 100 µL de EtBr e 0,5 µg de ADN. O valor da fluorescência residual foi depois subtraído aos valores de fluorescência dos lipoplexos e do controlo. O nível de acessibilidade do EtBr ao ADN nos lipoplexos foi calculado em termos de percentagem de controlo, em que o controlo correspondia a 100% de acessibilidade.

## 2.8 Preparação das células para estudos de transfecção

Para a realização de estudos de transfecção, as células foram plaqueadas com 80% de confluência, de forma a assegurar que estas estavam na sua fase de crescimento exponencial. O protocolo inicial para plaquear as células foi o mesmo que o aplicado na cultura de células (ponto 2.1-Materiais e Métodos). No entanto neste caso após a adição do meio de cultura para inibir e diluir a tripsina, procedeu-se à contagem das células usando um hemocítmetro a fim de determinar a densidade da suspensão celular.

Para estudos de transfecção envolvendo a luciferase, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $80 \times 10^3$  células (HepG2) por poço, em placas de 48 poços. Enquanto para estudos de transfecção envolvendo a GFP (proteína verde fluorescente), as células foram plaqueadas com uma densidade de  $320 \times 10^3$  células (HepG2) por poço, em placas de 12 poços.

## 2.9 Actividade biológica

### 2.9.1 Avaliação da expressão da luciferase

Para a execução do ensaio da actividade biológica, com lipoplexos preparados com o plasmídeo que codifica o gene da luciferase, primeiro foi removido o meio onde se encontravam as células e depois foi adicionado a cada poço 300  $\mu$ L de DMEM-HG. No caso em que se pretendia estudar o efeito de diferentes concentrações de galactose na transfecção com os lipoplexos, após a remoção do meio foi adicionado a cada poço 300  $\mu$ L de DMEM-HG com diferentes concentrações de galactose. O meio (DMEM-HG) com galactose foi adicionado 30 minutos antes da adição dos lipoplexos às células. O volume de lipoplexos, com 1  $\mu$ g de ADN, adicionado a cada poço foi de aproximadamente 200  $\mu$ L. De seguida à adição dos lipoplexos, as células foram a incubar a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas. Após as 4 horas, o meio com os lipoplexos foi removido e substituído por 1 mL de DMEM-HG e as células foram colocadas novamente a incubar, sob as mesmas condições referidas anteriormente, durante 48 horas.

Após as 48 horas de incubação, foi realizado o ensaio da viabilidade celular (ponto 2.10-Materiais e Métodos) para verificar se existe morte das células associada à transfecção. Seguidamente as células foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) e lisadas com 100  $\mu$ L de solução tampão de lise (1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 25 mM de Tris-fosfato, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15% de glicerol, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,8). Assim que as células destacaram do fundo dos poços, a placa foi colocada a – 80°C durante 10 minutos, para ajudar na lise celular, antes da avaliação da luminescência produzida pela luciferase.

Para a avaliação da expressão da luciferase, a placa foi retirada de – 80°C e colocada em gelo, assim como, o seu conteúdo foi transferido para os respectivos ependorfes, os quais se encontravam em gelo. Os ependorfes foram, depois, a centrifugar a 4°C com uma velocidade de 10000 rpm durante 5 minutos, numa centrífuga ScanSpeed 1730MR. Após o final da centrifugação, foram transferidos 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada ependorfe para uma placa branca com 96 poços, a qual esteve em gelo até ao momento da leitura.

Para este ensaio foram utilizadas uma solução de luciferina (167  $\mu$ M) e uma solução tampão de leitura (1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 25 mM de Tris-fosfato, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15% de glicerol e 1% (v/v), pH 7,8), as quais foram pré-aquecidas a 37°C. Ao tampão de leitura foi adicionado ATP, a uma concentração de 40 mM, imediatamente antes da leitura da placa.

O *software* do aparelho foi preparado para injectar 100  $\mu\text{L}$  de cada solução em cada poço da placa. Imediatamente antes da leitura, a placa foi aquecida a 37°C durante 1 minuto. A medição da luz produzida pela expressão da luciferase em cada amostra foi efectuada num luminómetro LMax II 384 (Molecular Devices, Union City, CA) (Faneca, et al., 2008).

O conteúdo proteico nos lisados celulares foi avaliado usando o reagente “Dc Protein Assay” (Bio-Rad, Hercules, CA) com soro albumina bovino (BSA-*bovine serum albumin*) como padrão (Faneca, et al., 2008). A proteína foi quantificada de acordo com o protocolo do fabricante. Neste sentido foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada amostra e de cada amostra do padrão numa placa de 96 poços. Depois, foi preparado o reagente A' que consiste numa mistura de 20  $\mu\text{L}$  de reagente S por cada mL de reagente A, o qual é necessário para a quantificação da proteína. Seguidamente à preparação do reagente A' foi adicionado em cada poço 25  $\mu\text{L}$  deste reagente e 200  $\mu\text{L}$  de reagente B, sendo depois a placa colocada a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, foi realizada a leitura a uma absorvância de 750 nm num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices). Foi encontrada uma relação linear entre a concentração da proteína e a absorvância lida, sendo possível gerar uma equação, usando os valores obtidos para o padrão, para calcular a concentração a partir da absorvância. Os valores da actividade biológica foram expressos em unidades relativas de luz (RLU) de luciferase por mg de total de proteína.

### **2.9.2 Avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo**

A eficiência da transfecção foi, também, avaliada pela medição da percentagem de células que expressavam GFP. Para este estudo de transfecção, foram preparados lipoplexos com o plasmídeo que codifica a GFP. Assim, removeu-se o meio onde as células se encontravam e depois adicionou-se em cada poço 900  $\mu\text{L}$  de DMEM-HG. De seguida adicionou-se o volume de lipoplexos, correspondente a 4  $\mu\text{g}$  de ADN, em cada poço. Após a adição dos lipoplexos, a placa foi a incubar a 37°C com uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 4 horas. Depois deste tempo, o meio com os lipoplexos foi removido e substituído com 2 mL de DMEM-HG e as células foram novamente colocadas a incubar, nas mesmas condições da incubação anterior, durante 48 horas.

Após as 48 horas, a placa foi retirada da incubadora e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Depois da lavagem das células, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de tripsina em cada poço e a placa foi a incubar a 37°C, durante 5 minutos, a fim de facilitar o destacamento das células. De seguida adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de DMEM-HG para inibir e diluir a tripsina. O meio de

cultura (DMEM-HG) deve estar em gelo. Seguidamente à realização da homogeneização em cada poço, para que não haja agregados celulares, o conteúdo de cada poço foi retirado para o respectivo tubo do citómetro, os quais devem estar em gelo. Os tubos do citómetro com os lisados celulares foram duas vezes a centrifugar a 4°C com uma velocidade de 950 rpm, durante 5 minutos, numa centrífuga 5810R. No final da centrifugação, foi retirado o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de PBS, mantido a 4°C, sendo que depois se realizou uma nova centrifugação, com as mesmas condições e centrifuga referida anteriormente. Isto para que se tenha a certeza que o meio foi totalmente removido, uma vez que o meio pode interferir com a leitura do citómetro.

Após a finalização da segunda centrifugação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se, novamente, 600 µL de PBS a 4°C. Os tubos foram mantidos em gelo até ao momento da leitura no citómetro de fluxo BD FACSCalibur™.

### **2.9.3 Avaliação da expressão de GFP por microscopia de fluorescência**

A avaliação da percentagem de células que expressavam GFP foi avaliada também por microscopia de fluorescência. Em que os lipoplexos foram, também, preparados com o plasmídeo que codifica para a GFP. Após as 24 horas de incubação do plaqueamento, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 900 µL de DMEM-HG a cada poço. O volume de lipoplexos adicionado a cada poço correspondia a 4 µg de ADN. No seguimento da adição dos lipoplexos, a placa foi colocada a incubar a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas. Após as 4 horas, o meio com os lipoplexos foi removido e substituído com 2 mL de DMEM-HG e as células foram novamente a incubar, nas mesmas condições anteriores, por mais 48 horas.

Passadas as 48 horas, a placa foi removida da incubadora e lavou-se 2 vezes as células com PBS. Depois da lavagem adicionou-se 500 µL de paraformaldeído (PFA) a 4% a cada poço e colocou-se a placa a incubar, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Após esta incubação fez-se três lavagens com PBS e procedeu-se à montagem das lâminas com o meio de montagem Mowiol<sup>R</sup> (Sigma Aldrich). As imagens foram tiradas com um microscópio Axio Observer (Carl Zeiss), com a objectiva de 20x.

### **2.10 Ensaio da viabilidade celular**

De seguida às 48 horas de incubação, realizadas após as transfecções, foi avaliada a viabilidade celular pelo método do “alamar blue”. Este método fornece, assim, uma medida

rápida e sensível da proliferação celular e citotoxicidade das células. Em que se utiliza um corante azul que irá ser incubado com as células transfectadas, que por si só não é fluorescente, no entanto quando reduzido apresenta uma mudança de cor, emitindo fluorescência, o que indica que existe proliferação celular. Neste sentido, este método tem como base uma reação de oxidação-redução (redox) do corante resazurin, o qual funciona como um indicador, uma vez que quando reduzido a resorufin, este indicador apresenta uma cor rosa, indicando uma viabilidade celular, com base na proliferação das células. Desta forma, este ensaio permite verificar, em adição à viabilidade celular, a capacidade redox das células num período de cultura desejado.

Para realizar este ensaio foi preparado DMEM-HG com 10% (v/v) de resazurina e de seguida adicionou-se 300 µL desta solução em cada poço. Após a adição da mistura, a placa foi a incubar a 37°C até que ocorresse uma mudança de cor de azul para rosa nos poços com as células controlo (células sem tratamento). Quando se verificou a mudança de cor nos poços controlo, a incubação foi interrompida e foram retirados 170 µL do sobrenadante de cada poço para uma placa de 96 poços. Por fim leu-se a absorvância a 570 e 600 nm num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices).

## **2.11 Avaliação da ligação e internalização dos complexos**

A avaliação da ligação e internalização dos lipoplexos foi determinada por um método fluorimétrico, usando uma sonda fluorescente, a rodamina-PE, em que a intensidade da fluorescência determina o grau de ligação e internalização da partícula nas células.

Para fazer este estudo foram plaqueadas 24 horas antes do ensaio duas placas de 48 poços, em que se colocou  $180 \times 10^3$  HepG2 por poço. Os lipoplexos foram preparados com 1% de rodamina-PE como está descrito no ponto 4 dos Materiais e Métodos. Após a preparação dos complexos, aspirou-se o meio das placas e adicionou-se 300 µL de DMEM-HG a cada poço. No caso das condições com galactose, adicionou-se 300 µL a cada poço, de uma mistura de DMEM-HG com o volume necessário de uma solução *stock* de galactoses para perfazer uma concentração de 40 mg/mL. Após a adição do meio com galactoses colocou-se as duas placas, uma para o ensaio da ligação e outra para o ensaio da internalização, a incubar a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente a esta incubação, levou-se novamente as duas placas a incubar por mais 30 minutos, no entanto a placa para o ensaio da ligação foi incubada a 4°C, enquanto que a placa para o estudo da internalização foi incubada a 37°C.

Após este último passo, os lipoplexos foram adicionados às células tendo-se realizado uma última incubação de duas horas e meia a 4°C e a 37°C, para avaliar a ligação e internalização respectivamente. As células foram, depois, lavadas duas vezes com PBS e lisadas com uma solução de 1% Triton X-100 (100 µl/poço). Por fim, a fluorescência foi medida com recurso a um fluorímetro SPECTRAmax GEMINI EM (Molecular Devices), utilizando os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 545 nm e 587 nm, respectivamente (Faneca, et al., 2008).

## **2.12 Análise estatística**

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0). A significância estatística das diferenças existentes entre as várias condições experimentais foi determinada por análise da variância “one-way ANOVA” utilizando o “Tukey test”. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

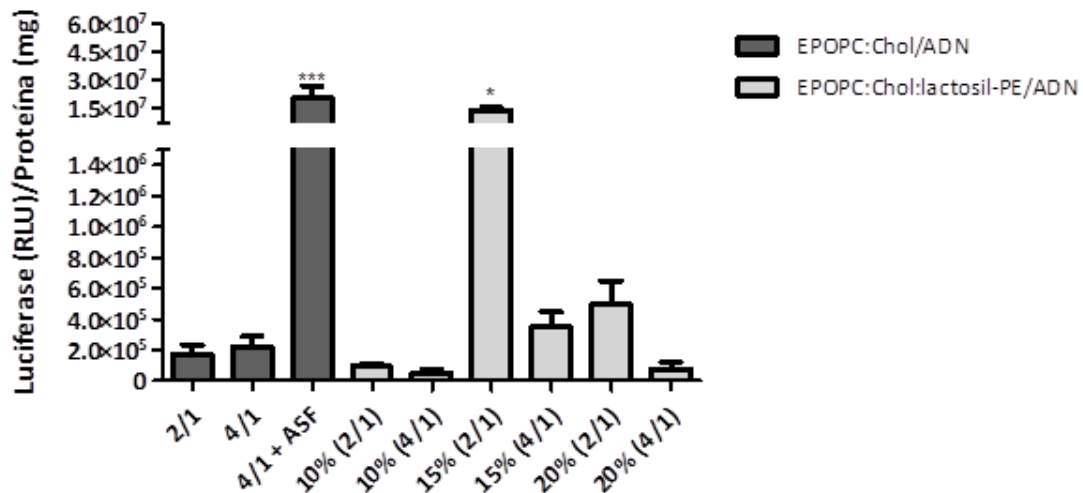




### **3.1 Efeito do lípido lactosil-PE na actividade biológica dos lipoplexos na linha celular HepG2**

O receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) é especificamente expresso em hepatócitos e sobreexpresso em células do hepatocarcinoma, como é o caso da linha celular HepG2, ligando-se de forma específica a resíduos de galactose e N-acetilgalactosamina (Ueno, et al., 2011) (Khorev, et al., 2008) (Geffen & Spiess, 1992). Neste sentido, o lípido lactosil-PE pode ser reconhecido de forma específica por estes receptores, uma vez que possui galactoses na extremidade do seu grupo polar. De modo a avaliar o efeito deste lípido na capacidade de transfecção do sistema de transporte de base lipídica, analisou-se, por luminescência, os níveis de expressão de gene de luciferase em células de hepatocarcinoma (HepG2), com diferentes formulações de lipoplexos (Figura 11). Os resultados são apresentados em unidades relativas de luz (RLU) por quantidade de proteína celular total, em mg. Para esta análise, utilizaram-se lipoplexos constituídos por EOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, preparados nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, na ausência ou presença de diferentes percentagens do lípido lactosil-PE, assim como, lipoplexos, EOPC:Chol/ADN, preparados na presença de 20 µg asialofetuína (ASF)/µg de ADN associada electrostaticamente. Os lipoplexos contendo ASF foram considerados como referência, uma vez que esta glicoproteína é um ligando específico dos ASGP-Rs, tendo já sido demonstrado que a associação da ASF a este tipo de lipoplexos resulta numa elevada potenciação da sua actividade biológica.

Na realização deste ensaio utilizaram-se diferentes percentagens do lípido lactosil-PE, nomeadamente 10%, 15% e 20%, para desenvolver a formulação de lipossomas catiónicos EOPC:Chol:lactosil-PE, no sentido de verificar como é que as diferentes percentagens de lípido afectam a actividade biológica dos complexos.



**Figura 11** - Efeito do lípido lactosil-PE, na formulação dos lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, na expressão dos níveis de gene da luciferase na linha celular HepG2. Os lipoplexos foram preparados na razão de carga (+/-) (2/1) e (4/1), na ausência ou presença do referido lípido (com 10%, 15% ou 20% do lípido) ou preparados com 20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN. Após terem sido preparadas as diferentes formulações, foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro. Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de dois ensaios independentes. Os asteriscos ( \*\*\* p <0,001) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos EPOPC:Chol/ADN, associados à asialofetúina. Estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com lipoplexos preparados apenas com EPOPC:Chol na sua constituição lipídica.

Pela análise da Figura 11 é possível verificar que a actividade biológica dos lipoplexos com 10% de lípido, preparados nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, foi bastante reduzida, sendo que a quantidade de transgene expresso não apresenta diferença face à condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) para ambas as razões de carga. No entanto, a utilização da formulação preparada com 15% e 20% de lípido, numa razão de carga (+/-) 2/1, resultou em um aumento de transgene expresso, relativamente aos níveis verificados na condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) para a mesma razão de carga, constatando-se uma potenciação da actividade biológica destes complexos. Isto pode dever-se ao facto deste lípido ser uma fosfotidietanolamina com uma lactose ligada ao seu grupo polar, apresentando esta lactose uma galactose disponível para se ligar ao receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) presentes nestas células (HepG2). No caso dos lipoplexos preparados na razão de carga de (+/-) 4/1 verificou-se uma actividade biológica reduzida, com baixos níveis de expressão de gene da luciferase, para todas as percentagens de lípido lactosil-PE. Esta redução dos níveis de transfecção pode ser explicada pelo facto de o ADN estar demasiado condensado nos

lipoplexos preparados a uma razão de carga (+/-) 4/1, relativamente aos complexos preparados a uma razão de carga (+/-) 2/1, uma vez que a elevada condensação do material genético pode dificultar a sua libertação dos complexos e, conseqüentemente, a sua entrada no núcleo para ser transcrito, resultando assim em baixos níveis de transfecção.

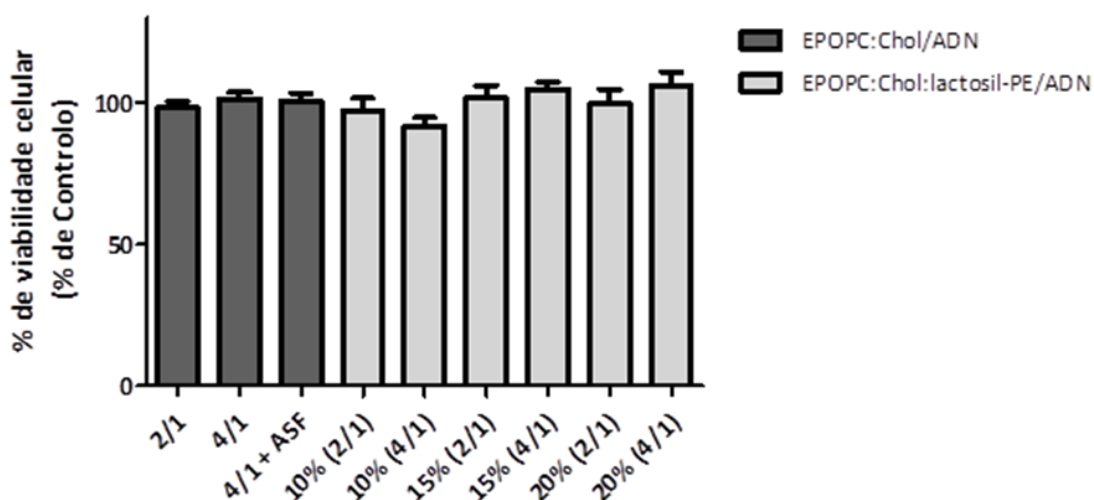
Para o caso da associação da ASF aos lipoplexos, EOPC:Chol/ADN, verifica-se uma potenciação substancial da transfecção, em que esta potenciação pode ser devida ao facto da ASF ser um ligando específico dos ASGP-Rs, os quais se encontram sobreexpressos nas células do hepatocarcinoma, facilitando, assim, a ligação e internalização destes complexos por endocitose mediada pelo receptor de asialoglicoproteína.

Pela Figura 11 é então possível constatar que apesar dos níveis de transfecção de lipoplexos com 15% de lactosil-PE, na razão de carga (+/-) 2/1, serem inferiores à actividade biológica obtida com a associação de ASF aos lipoplexos, os níveis de expressão de transgene verificados são significativamente elevados face à formulação controlo (sem o lípido) na mesma razão de carga. Neste sentido, a diferença dos níveis de transgene expresso obtida entre a formulação referência (lipoplexos associados à ASF) e os lipoplexos com 15% de lactosil-PE não é significativa, indicando o elevado potencial de ambas as formulações para a entrega de material genético em HCC. Deste modo, a diferença verificada pode ser devido a uma maior especificidade da conformação das galactoses livres da ASF para os ASGP-Rs, relativamente à disposição da galactose disponível do lípido lactosil-PE.

### **3.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pelos lipoplexos em células HepG2**

Uma vez que o uso de lipossomas catiónicos é geralmente associado a alguma citotoxicidade para as células (Faneca, et al., 2004), afectando desta forma a actividade biológica dos complexos, realizaram-se estudos de viabilidade celular utilizando o método de Alamar Blue. Este método tem como base a redução do corante rezasurina, pelos mecanismos redutores da célula, em resorufina, avaliando desta forma o estado metabólico da célula.

Os resultados obtidos para os estudos de viabilidade demonstram que ocorreu uma baixa citotoxicidade para as células, após a incubação das mesmas com as diferentes formulações de complexos, o que mostra que a viabilidade celular não foi significativamente afectada pela transfecção realizada (Figura 12).

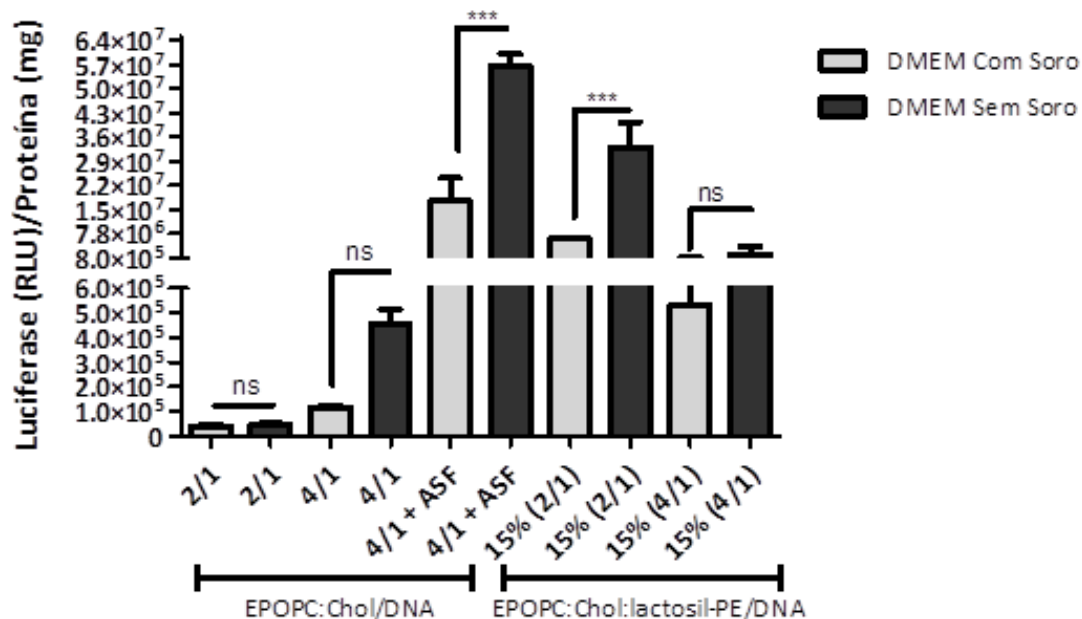


**Figura 12** – Efeito dos complexos lipossomas catiónicos/ADN na viabilidade das células HepG2. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue como descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os dados deste ensaio foram expressos em viabilidade de células de percentagem de controlo, células sem tratamento, sendo os resultados apresentados (média  $\pm$  desvio padrão de triplicados) representativos de dois ensaios independentes.

### 3.3 Efeito do soro na actividade biológica dos complexos lipossoma catiónico/ADN na linha celular HepG2

A administração sistémica de lipoplexos *in vivo* leva a que estes se deparem com vários obstáculos, como as proteínas presentes no soro, uma vez que estas proteínas podem interagir com os lipoplexos e conseqüentemente removê-los da circulação sanguínea. Deste modo a presença de soro constitui uma barreira à eficiência de transfecção destes vectores, visto regra geral promover uma diminuição significativa da quantidade de transgene expresso (Wang, et al., 2012) (Resina, et al., 2009).

No ponto 3.1 verificou-se que a formulação base de lipossomas catiónicos (EPOPC:Chol) com 15 % do lípido lactosil-PE foi a que resultou numa maior quantidade de transgene expresso, próximo do valor obtido para a formulação referência (ASF-EPOPC:Chol/ADN). Desta forma pretendeu-se verificar se a presença de soro alterava de forma significativa a actividade de transfecção desta formulação, através de um ensaio de actividade biológica realizado na presença de meio de cultura com soro e de meio de cultura sem soro.



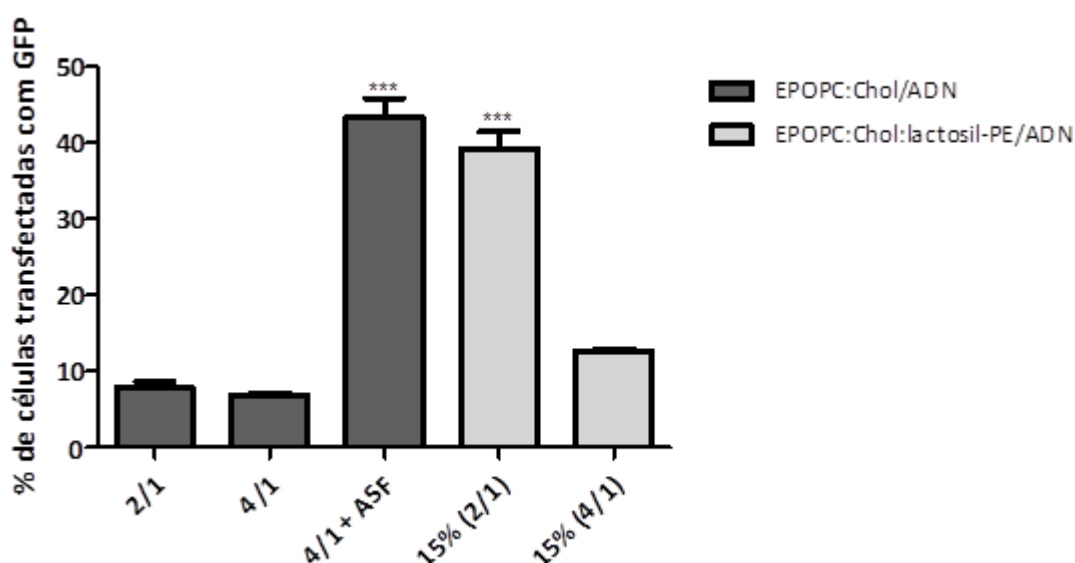
**Figura 13** – Efeito da presença de soro na eficiência de transfecção dos lipoplexos em células HepG2. Foi avaliada a capacidade de transfecção das formulações de lipoplexos, EPOPC:Chol/ADN, com ou sem 15% do lípido lactosil-PE, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, assim como, da formulação referência, ASF-EPOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1. Os complexos foram incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro e sem soro a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos ( \*\*\* p <0,001; \*\* p <0,01) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, na razão de carga (+/-) 2/1, e com os complexos associados à ASF na ausência de soro, os quais diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos complexos na presença de soro.

Pelos resultados obtidos na Figura 13 é possível verificar que em todas as condições a presença de soro provoca uma diminuição na quantidade de transgene expresso, sendo que existe uma diminuição significativa da actividade de transfecção da formulação de lipoplexos preparados com os lipossomas catiónicos contendo 15% do lípido lactosil-PE, para a razão de carga (+/-) 2/1, o mesmo se tendo verificado para a formulação referência (na presença de ASF).

A diferença significativa verificada na quantidade de transgene expresso na formulação com o lípido lactosil-PE, preparado a uma razão de carga (+/-) (2/1), pode ser explicada pela presença de proteínas no soro, as quais se encontram carregadas negativamente o que promove a ligação das mesmas ao lipoplexos formando aglomerados ou provocando a dissociação dos complexos (Resina, et al., 2009) e, desta forma, inibindo a eficiência de transfecção destes complexos.

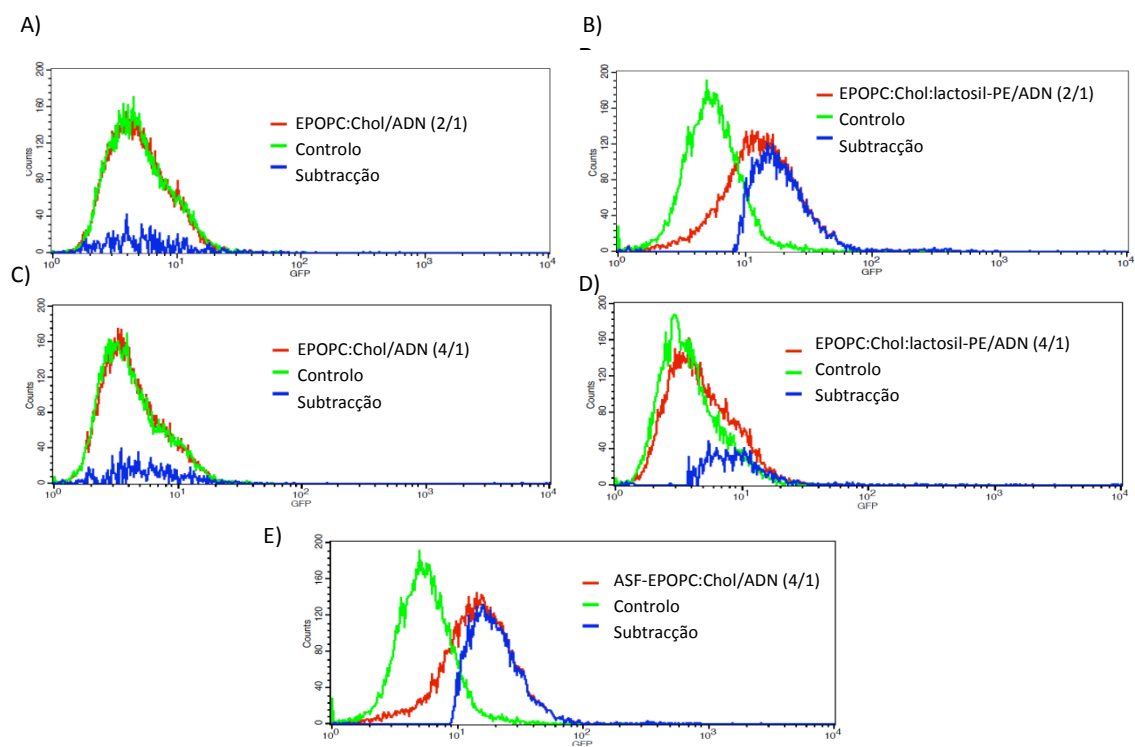
### 3.4 Avaliação da percentagem de transfecção da linha celular HepG2

De maneira a avaliar a influência da incorporação do lípido lactosil-PE nos lipossomas catiónicos, na percentagem de células transfectadas prepararam-se as diferentes formulações de lipoplexos com o plasmídeo que codifica para a proteína verde fluorescente (*GFP-Green Protein Fluorescence*) e utilizou-se a técnica de citometria de fluxo para quantificar a percentagem de células transfectadas. Para este estudo apenas foram utilizadas as formulações de lipoplexos que apresentaram maior actividade biológica no ensaio de luminescência e as respectivas formulações controlo. Assim, as formulações avaliadas neste ensaio corresponderam à formulação controlo (EOPC:Chol/ADN) na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1, à formulação referência (ASF-EOPC:Chol/ADN), na razão de carga (+/-) 4/1, e à formulação com 15% do lípido lactosil-PE (EOPC:Chol:lactosil-PE/ADN) na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1.



**Figura 14** - Efeito do lípido lactosil-PE na percentagem de células HepG2 transfectadas com a formulação de lipoplexos EOPC:Chol:lactosil-PE/DNA. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas os lipoplexos controlo (EOPC:Chol/ADN) e a formulação referência (20 µg de asialofetuína/µg de ADN associada aos complexos EOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1). Após terem sido preparadas as diferentes formulações, foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro. A percentagem de células transfectadas, expressando GFP, foi obtida 48 horas depois da transfecção, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de duplicados) representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*\* p <0,001) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% do lípido lactosil-PE na formulação, para a razão de carga (+/-) 2/1, ou para lipoplexos, EOPC:Chol/ADN associados à asialofetuína, uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com lipoplexos preparados apenas com EOPC:Chol na mesma razão de carga.

Pela Figura 14 pode assim verificar-se que a utilização dos lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, resultou numa elevada percentagem de células HepG2 transfectadas, tendo esta sido superior aos valores obtidos para a formulação controlo (EPOPC:Chol/ADN). Estes complexos, EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%), na razão de carga (+/-) 2/1, transfectaram cerca de 40% das células, segundo os resultados obtidos por citometria de fluxo, não havendo uma diferença significativa face aos resultados obtidos para a formulação referência (ASF associada aos lipoplexos EPOPC:Chol/ADN). Em relação aos lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados a uma razão de carga (+/-) 4/1, observou-se uma maior percentagem de células transfectadas relativamente ao observado com a formulação controlo, mas significativamente inferior à obtida com a mesma formulação preparada numa razão de carga (+/-) 2/1.



**Figura 15** – Histogramas de citometria de fluxo obtidos nos estudos de transfecção de células HepG2 com várias formulações. O traçado a vermelho corresponde a histogramas das células transfectadas com os diferentes complexos utilizados. O traçado a verde corresponde a histogramas de células controlo, as quais não sofreram tratamento (células não transfectadas). O traçado a azul corresponde a histogramas resultantes da subtração dos histogramas das células controlo (traço azul) aos histogramas das células transfectadas com os vários complexos (traço vermelho). A) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (2/1); B) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (2/1); C) EPOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1); D) EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (4/1); E) ASF-EPOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1).



Os resultados apresentados na Figura 15 correspondem aos histogramas de citometria de fluxo relativos à transfecção da linha celular HepG2 com os diferentes complexos utilizados.

Analisando os resultados obtidos pela Figura 14 e pela Figura 15 pode verificar-se que os lipoplexos preparados com 15% de lípido lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, foram os que resultaram numa maior percentagem de células transfectadas, próximo dos resultados obtidos para a formulação referência (ASF-EOPC:Chol/ADN). Neste sentido, os resultados obtidos no ensaio de citometria de fluxo estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de luminescência (Figura 11), mostrando que os lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, apresentam uma elevada actividade biológica, tanto em termos de expressão de transgene como em termos de percentagem de células transfectadas, sendo esta próxima da verificada com a formulação referência. Esta potenciação da actividade biológica dos complexos, induzida pela incorporação de 15% de lactosil-PE nos lipossomas catiónicos, deve-se provavelmente à interacção deste componente (lactosil-PE) com o ASGP-R, promovendo a ligação e internalização dos lipoplexos pelas células HepG2 induzindo, conseqüentemente, um aumento da capacidade de transfecção.

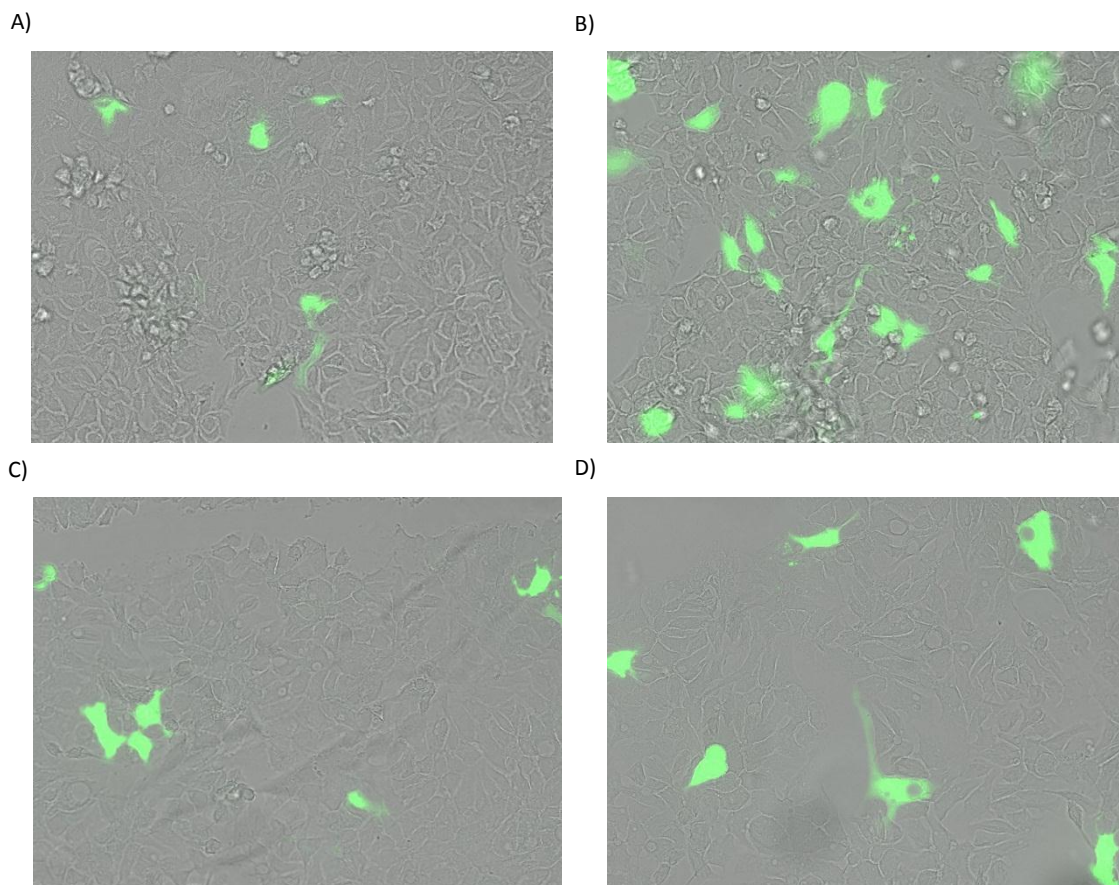
Por outro lado com os lipoplexos (EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN), preparados na razão de carga (+/-) 4/1, verificou-se uma reduzida percentagem de células a expressar GFP, o que também se encontram de acordo com a baixa quantidade de transgene expresso verificada no ensaio de luminescência (Figura 11).

### **3.5 Avaliação dos níveis de transfecção das células HepG2 por Microscopia de fluorescência**

De forma a avaliar a capacidade de transfecção dos lipoplexos EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN, e correlacionar os resultados obtidos nos ensaios de luminescência com os dos ensaios de citometria de fluxo recorreu-se à técnica de microscopia de fluorescência. Esta técnica permite analisar qualitativamente a actividade biológica dos lipoplexos em termos de transgene expresso e células transfectadas.

Pelos resultados apresentados na Figura 16 é possível constatar que a transfecção com a formulação de lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, resultou num maior número de células transfectadas, ou seja, que expressam GFP, relativamente ao obtido com os complexos controlo (EOPC:Chol/ADN), preparados na mesma razão de carga. Para a formulação EOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1, observou-se um ligeiro aumento do número de células transfectadas comparativamente à

condição controlo. Contudo, o número de células transfectadas com esta formulação foi muito inferior ao observado com os lipoplexos, preparados com 15% de lactosil-PE na razão de carga (+/-) 2/1.



**Figura 16** - Efeito do lípido lactosil-PE na eficiência de transfecção dos lipoplexos EOPC:Chol:lactosil-PE em células HepG2. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas as formulações controlo (EOPC:Chol/ADN) na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Após terem sido preparadas as diferentes formulações, estas foram incubadas com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro. As células transfectadas, que expressam GFP, foram obtidas 48 horas após a transfecção e analisadas por microscopia de fluorescência com uma ampliação de 20x. Este ensaio é representativo de três ensaios independentes. A) EOPC:Chol/ADN (+/-) (2/1); B) EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (2/1); C) EOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1); D) EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (4/1).

Os resultados obtidos neste ensaio estão, assim, de acordo com os verificados nos ensaios de luminescência e de citometria de fluxo, corroborando com a hipótese de que os lipoplexos preparados com 15% de lactosil-Pe, na razão de carga (+/-) 2/1, são internalizados pelas células HepG2 por endocitose mediada por receptor através da interacção das galactoses presentes no lípido lactosil-PE, com os ASGP-Rs, os quais se encontram sobreexpressos na

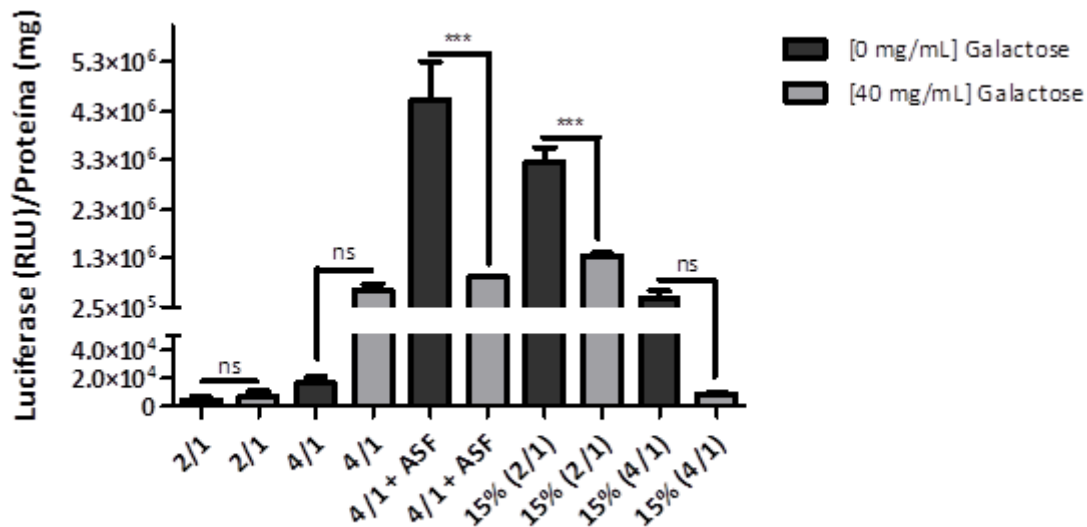
linha celular HepG2, resultando desta forma um aumento substancial da eficiência de transfecção desta formulação.

### **3.6 Efeito da presença de galactose na actividade biológica dos complexos lipossomas catiónicos/ADN na linha celular HepG2**

Como já foi referido no ponto 3.1, os ASGP-Rs ligam especificamente resíduos de galactose ou de N-acetilgalactosamina. Neste sentido, vários estudos realizados já demonstraram que a afinidade entre o ligando e o receptor é determinada por vários parâmetros, incluindo a disposição das galactoses, o número de galactoses disponíveis, entre outras.

Assim, através deste ensaio pretendeu-se demonstrar que a presença do lípido lactosil-PE, o qual apresenta uma galactose no grupo polar, na formulação de lipossomas catiónicos é responsável pela potenciação da actividade biológica destes complexos, uma vez que as galactoses disponíveis podem ser reconhecidas especificamente pelos ASGP-Rs, facilitando a internalização dos lipoplexos por endocitose mediada por receptor. Com este objectivo, adicionou-se uma concentração de 40 mg de galactose/mL ao meio e de seguida incubou-se esta solução com as células HepG2, antes de se realizar a transfecção, de modo a verificar se a presença de galactose no meio diminuía a actividade biológica dos lipoplexos.

Neste âmbito avaliaram-se os lipoplexos com maior actividade de transfecção, lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE na sua constituição lipídica, preparados nas razões de carga (+/-) 2/1 e (+/-) 4/1, e tendo como controlo lipoplexos preparados nas mesmas razões de carga, sem lactosil-PE. Como condição referência utilizaram-se lipoplexos contendo ASF, preparados na razão de carga (+/-) 4/1.



**Figura 17** – Efeito da galactose na actividade biológica dos lipoplexos. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas a condição controlo (EOPC:Chol/ADN) e a condição referência (20 µg de asialofetúina/µg de ADN associada aos complexos EOPC:Chol/ADN). Os lipoplexos foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro na ausência ou presença de 40 mg galactose/mL. Os níveis de expressão do gene da luciferase foram obtidos 48 horas depois da transfecção, sendo apresentados em luciferase (RLU)/proteína (mg), em que os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*\*) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% lactosil-PE e para os lipoplexos referência (com ASF), uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos lipoplexos, na ausência de galactose.

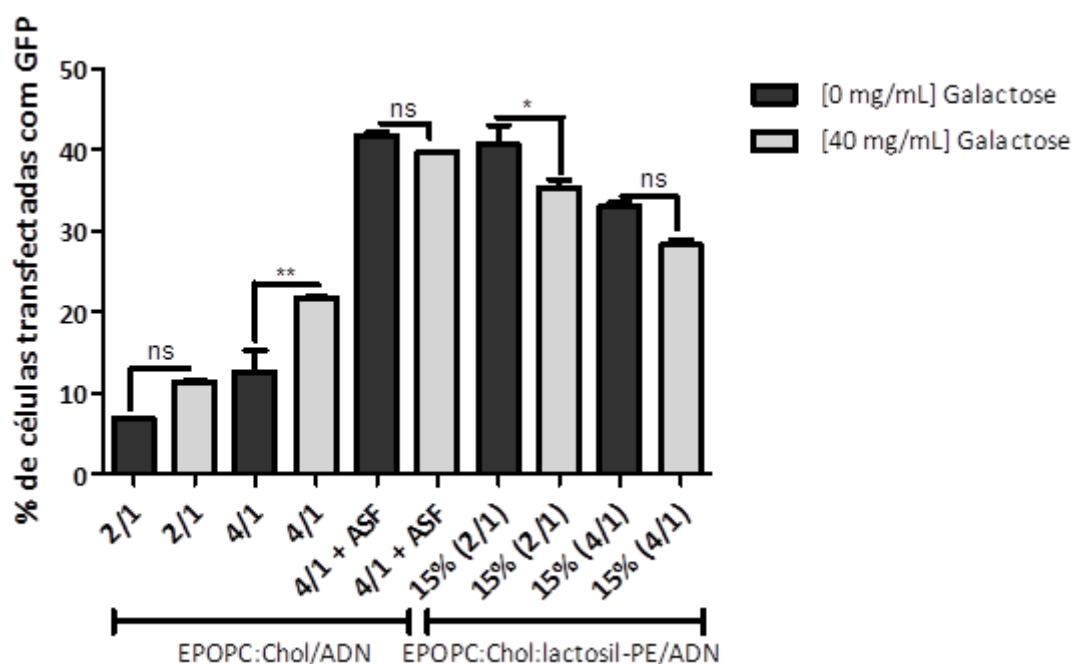
Através dos resultados apresentados na Figura 17 pode verificar-se que a presença da concentração de 40 mg de galactose/mL potenciou ligeiramente a actividade biológica dos lipoplexos sem o lípido lactosil-PE (condição controlo), tanto quando preparados na razão de carga (+/-) 2/1 como na razão de carga (+/-) 4/1. Este aumento da capacidade de transfecção dos complexos preparados sem o lípido lactosil-PE (EOPC:Chol/ADN) pode ser devido à associação das galactoses, que se encontram no meio de transfecção, aos lipoplexos promovendo a interacção com os receptores de asialoglicoproteína, e conseqüentemente um aumento da internalização celular e da actividade biológica.

Relativamente à condição com 15% de lactosil-PE, verificou-se uma diminuição da quantidade de transgene expresso quando preparada na razão de carga (+/-) 4/1, em que para lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, a diminuição verificada foi significativa face aos valores de transgene expresso obtidos para a mesma formulação, na ausência de galactose, tendo-se verificado o mesmo para a condição referência (ASF-EOPC:Chol/ADN). Esta diminuição pode dever-se à competição, entre as galactoses

livres e a galactose do lípido lactosil-PE, existente nos lipoplexos, pela ligação aos ASGP-Rs das células HepG2, promovendo desta forma uma menor ligação e internalização celular dos lipoplexos contendo lactosil-PE, o que conseqüentemente conduz a uma menor actividade biológica destes lipoplexos.

Pelos resultados apresentados na Figura 18 é possível constatar que a presença de galactose no meio promoveu, não apenas uma diminuição na expressão de transgene, mas também uma diminuição significativa da percentagem de células transfectadas com a formulação de lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE, e preparada na razão de carga (+/-) 2/1. Um resultado semelhante foi observado quer com a formulação de lipoplexos (contendo 15% de lactosil-PE), preparada na razão de carga (+/-) 4/1, quer com a formulação referência contendo ASF. Estes resultados demonstram que existe competição, entre as moléculas de galactose presentes no meio e as dos lipoplexos com lactosil-PE, pela ligação aos receptores de asialoglicoproteína, levando a uma menor ligação e internalização destes complexos e, conseqüentemente, a uma diminuição da sua eficiência de transfecção.

Os resultados ilustrados na Figura 18 mostram que os complexos controlo (EOPC:Chol/ADN) sofreram um aumento da sua eficiência de transfecção na presença de galactose, sendo particularmente evidente para a razão de carga (+/-) 4/1. Este aumento pode ser devido à associação das galactoses livres a estes lipoplexos provocando desta forma um aumento da internalização dos complexos, e logo um dos níveis de transfecção desta formulação nas células HepG2.



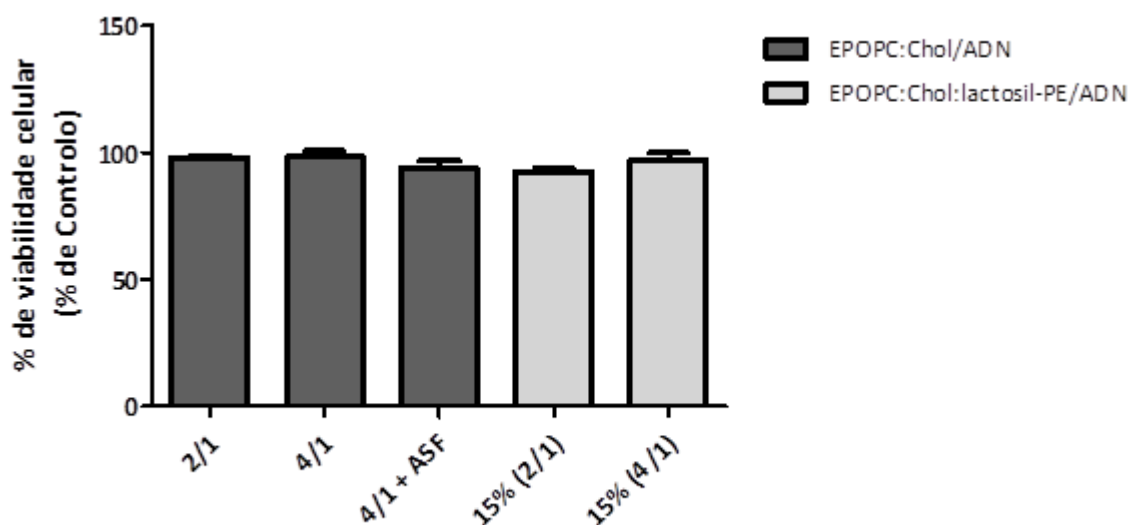
**Figura 18** - Efeito da presença de galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas com lipoplexos. Os lipoplexos foram preparados com 15% do lípido lactosil-PE na formulação de lipossomas catiónicos, na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Foram também preparadas a condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) e a condição referência (20 µg de asialofetuína/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN). Os lipoplexos foram incubados com as células durante 4 horas, em meio de cultura com soro na ausência ou presença de 40 mg galactose/mL. A percentagem de células transfectadas, expressando GFP, foi obtida 48 horas depois da transfecção, sendo os resultados apresentados (média ± desvio padrão de duplicados) representativos de pelo menos dois ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*p<0,01; \*p<0,05) correspondem aos valores obtidos para células tratadas com complexos contendo 15% lactosil-PE e para lipoplexos sem lactosil-PE, na presença de galactose, uma vez que estes valores diferem significativamente dos obtidos em células tratadas com os mesmos lipoplexos, na ausência de galactose.

### 3.7 Efeito da presença de galactose na viabilidade das células HepG2

Como já foi referido no ponto 3.2, os ensaios de viabilidade celular foram realizados pelo método do Alamar Blue, o qual avalia o estado metabólico das células.

Este ensaio foi realizado em células HepG2 transfectadas com lipoplexos com o lípido lactosil-PE, com lipoplexos sem o respectivo lípido (lipoplexos controlo) e com lipoplexos associados à ASF (condição referência) com o intuito de verificar se a presença destes complexos conjuntamente com uma elevada concentração de galactose (40 mg galactose/mL) causava citotoxicidade para as células.

Pelos resultados apresentados na Figura 19 é possível verificar que as diferentes condições de tratamento não introduziram uma citotoxicidade significativa nas células HepG2

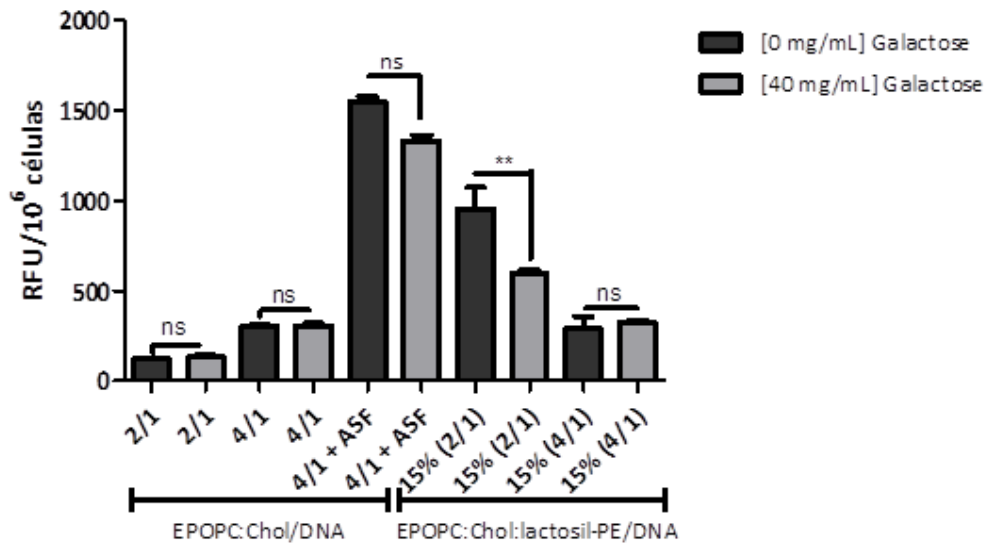


**Figura 19** - Efeito da presença de galactose e de lipoplexos na viabilidade celular das células HepG2. A concentração de solução de galactoses adicionada ao meio com as células foi de 40 mg galactose/mL. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue como descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os dados deste ensaio foram expressos em percentagem de viabilidade de células controlo, células sem tratamento, sendo os resultados apresentados (média  $\pm$  desvio padrão de triplicados) representativos de três ensaios.

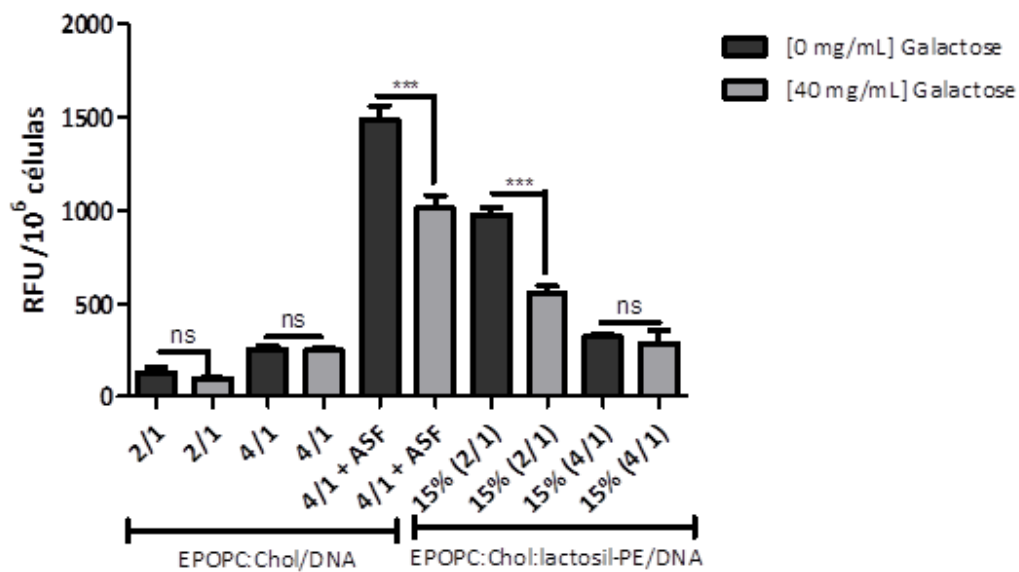
### 3.8 Avaliação da ligação e internalização dos lipoplexos nas células HepG2

No sentido de avaliar se a potenciação da actividade biológica dos lipoplexos em estudo se devia à interacção das galactoses disponíveis das moléculas de lactosil-PE com os receptores de asialoglicoproteína realizou-se um ensaio de ligação e internalização celular, no qual as células HepG2 foram incubadas com lipoplexos contendo 1% da sonda fluorescente rodamina-PE.

A)



B)



**Figura 20** – Avaliação da ligação (A) e internalização celular (B) das diferentes formulações de lipoplexos na linha celular HepG2. Os lipoplexos, preparados com 1% de rodamina-PE, foram preparados na razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1 com e sem 15% de lactosil-PE e com 20 µg de asialofetuína/µg de ADN associada aos complexos EPOPC:Chol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1. As células foram depois incubadas com as diferentes formulações na ausência ou presença de 40 mg/mL de galactoses, a 4°C (ligação) ou a 37°C (internalização). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes e foram expressos em RFU/10<sup>6</sup> células. Os asteriscos (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001) correspondem aos valores obtidos para a condição referência (lipoplexos preparados com asialofetuína), no estudo da ligação e internalização celular dos lipoplexos, os quais diferem significativamente dos obtidos com as células tratadas com os mesmos lipoplexos na ausência de galactose.



O ensaio de ligação foi realizado a 4°C para que o metabolismo celular estivesse inibido e conseqüentemente não ocorresse a internalização celular, sendo assim possível avaliar apenas a ligação dos lipoplexos às células. Por outro lado, o ensaio de internalização celular foi realizado a 37°C, avaliando-se deste modo tanto a ligação como a internalização celular dos lipoplexos.

Neste âmbito os resultados adquiridos neste ensaio encontram-se representados na Figura 20, podendo-se constatar que houve um aumento significativo da ligação e internalização celular dos lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, relativamente à formulação controlo (EPOPC:Chol/ADN) na mesma razão de carga. O mesmo não se verificou com os lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, preparados na razão de carga (+/-) 4/1, uma vez que se obteve valores de ligação e internalização próximos dos obtidos para a condição controlo produzida na mesma razão de carga. O aumento registado com a formulação com 15% de lípido, na razão de carga (+/-) 2/1, pode dever-se à interacção com os ASGP-Rs, os quais se encontram sobreexpressos na linha celular HepG2, que conseqüentemente pode induzir uma maior ligação e internalização dos lipoplexos. Em relação à condição referência (ASF-EPOPC:Chol/ADN) verificou-se um aumento significativo dos valores de ligação e internalização face à formulação controlo (EPOPC:Chol/ADN), como também face à formulação de lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE.

Relativamente ao efeito da galactose na ligação e internalização das condições estudadas verificou-se que a presença de galactose induzia uma diminuição significativa tanto na taxa de ligação como na taxa de internalização dos lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1. Do mesmo modo, verificou-se que para a condição de referência (ASF-EPOPC:Chol/ADN) ocorreu uma redução dos valores obtidos para a taxa de ligação, sendo a redução observada para a taxa de internalização significativa (Figura 20). No entanto, para as condições controlo, em ambas as razões de carga, e para a condição com 15% de lactosil-PE, na razão de carga (+/-) 4/1, não se verificou praticamente nenhuma alteração dos valores obtidos na presença de galactose em relação aos obtidos na sua ausência (Figura 20).

Os resultados obtidos para a formulação de lipoplexos com 15% de lípido, na razão de carga (+/-) 2/1, encontram-se de acordo com o esperado. Estes resultados mostram, desta forma, que estes lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, provavelmente interagem com os ASGP-Rs, ligando-se aos mesmos e sofrendo endocitose mediada por receptor.

### 3.9 Caracterização físico-química dos lipoplexos

A eficiência dos sistemas de transporte na entrega do material genético nas células alvo depende das características físico-químicas dos vectores utilizados, uma vez que estas características podem afectar a estabilidade e a actividade biológica dos mesmos (Faneca, et al., 2002; Faneca, et al., 2004; Ma, et al., 2007). É neste sentido que se torna crucial estudar estes parâmetros e controlá-los.

#### 3.10.1 Avaliação do diâmetro dos lipoplexos

O diâmetro médio dos lipoplexos foi uma das características físico-químicas avaliadas, uma vez que pode determinar a via endocítica pela qual os complexos internalizam as células (Ma, et al., 2007).

Neste sentido, na Tabela 1 encontra-se ilustrado o diâmetro médio das formulações de lipoplexos, usadas ao longo deste trabalho experimental, em que se pode verificar que tanto na condição controlo (EPOPC:Chol/ADN) como nos lipoplexos preparados com 15% de lactosil-PE (EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN) se verificou diferenças no tamanho dos complexos consoante a razão de carga a que estes foram preparados. Os lipoplexos, com ou sem lactosil-PE, preparados numa razão de carga (+/-) 2/1, apresentam valores de diâmetro médio superiores aos valores obtidos para lipoplexos preparados com as mesmas formulações lipídicas, na razão de carga (+/-) 4/1. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que a razão de carga a que os lipoplexos são preparados pode influenciar o tamanho desses mesmos complexos, ou seja, o aumento do número de cargas positivas leva a que haja um aumento das forças electroestáticas repulsivas entre eles, induzindo consequentemente, uma diminuição do seu tamanho, daí os lipoplexos preparados numa razão de carga (+/-) 4/1 apresentarem menor dimensão que os lipoplexos preparados numa razão de carga (+/-) 2/1 (Ma, et al., 2007; Almofti, et al., 2003).

Ainda pelos resultados da Tabela 1 é possível verificar diferenças no diâmetro médio da formulação de lipoplexos, contendo 15% de lactosil-PE, entre a razão de carga (+/-) 2/1 e 4/1. Estas diferenças podem ser explicadas pela presença do dobro de cargas positivas, para os complexos preparados na razão de carga (+/-) 4/1, relativamente aos complexos preparados para a razão de carga (+/-) 2/1, o que leva a que haja um aumento das forças electroestáticas induzindo uma maior complexação dos lipoplexos, preparados na razão de carga (+/-) 4/1, e,

deste modo, uma diminuição do tamanho destes mesmos complexos face aos preparados na razão de carga (+/-) 2/1 (Ma, et al., 2007).

Como é possível verificar pelos resultados da Tabela 1, lipoplexos contendo lactosil-PE, preparados para ambas as razões de carga, apresentam tamanhos menores face aos lipoplexos controlo, uma vez que a presença deste lípido pode induzir uma menor agregação entre os complexos.

**Tabela 1** - Avaliação do diâmetro médio (nm) dos lipoplexos. Foram utilizados complexos, contendo 15% de lactosil-PE (EOPC:Chol:lactosil-PE/ADN) e lipoplexos controlo (EOPC:Chol/ADN), ambas as formulações de lipoplexos preparadas nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, como se encontra descrito no capítulo 2 (Materiais e Métodos). Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de 3 medições independentes.

Lipoplexos	Diâmetro médio (nm)
EOPC:Chol/ADN (+/-) (2/1)	1501,5 $\pm$ 0,59
EOPC:Chol/ADN (+/-) (4/1)	430,4 $\pm$ 11,14
EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (2/1)	778,9 $\pm$ 18,43
EOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) (4/1)	280,4 $\pm$ 2,16

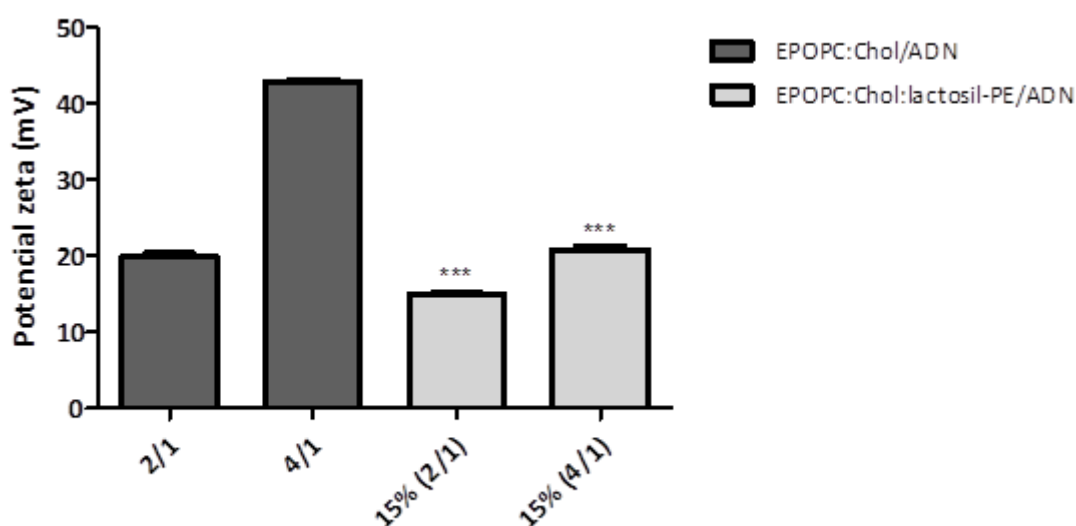
Desta forma, os lipoplexos contendo 15% de lactosil-PE, preparados numa razão de carga (+/-) 2/1, apresentam uma maior dimensão, o que induz uma menor complexação dos lipoplexos, facilitando assim a libertação do material genético dos complexos. Consequentemente, isto leva a que lipoplexos, EOPC:Chol:lactosil-PE/ADN, preparados a uma razão de carga (+/-) 2/1 detenham maiores taxas de transfecção.

### **3.10.2 Avaliação da carga superficial dos lipoplexos**

A carga superficial dos lipoplexos é também uma característica físico-química de grande importância e que se encontra inter-relacionada com o diâmetro médio dos lipoplexos, uma vez que pode influenciar a via de internalização dos complexos, assim como, a interacção com as células alvo (Ma, et al., 2007).

A carga superficial dos complexos é determinada pela sua composição, incluindo a razão de carga a que os complexos lipossomas catiónicos/ADN são preparados, devido ao ADN apresentar carga negativa e os lipossomas em estudo apresentarem carga positiva. Assim, a carga superficial dos complexos foi avaliada recorrendo à medição do potencial zeta, como descrito no capítulo 2 – Materiais e Métodos.

Pelos resultados apresentados na Figura 21 é possível verificar que lipoplexos com 15% de lactosil-PE, preparados na razão de carga (+/-) 4/1 apresentam valores de potencial zeta superiores ao potencial zeta obtido para os mesmos complexos mas preparados numa razão de carga (+/-) 2/1. O mesmo se verifica para os lipoplexos controlo (EPOPC:Chol/ADN), em que para a razão de carga (+/-) 4/1 apresentam um potencial zeta de +42,9 mV enquanto para a razão de carga (+/-) 2/1 detêm um potencial zeta de +19,9 mV. Desta forma, a maior razão de carga dos complexos lipossoma catiónico/ADN (+/-) corresponde a um maior valor de potencial zeta (Faneca, et al., 2002). Pelos resultados apresentados na Figura 21 constata-se também que o potencial zeta dos lipoplexos preparados com 15% de lactosil-PE é inferior ao potencial zeta dos lipoplexos controlo preparados na mesma razão de carga, o que pode ser justificado pela presença do lípido lactosil-PE, que apesar de não apresentar carga, pode mascarar a carga positiva do lípido catiónico e/ou induzir alterações conformacionais dos complexos e diminuir a sua carga superficial.



**Figura 21** - Avaliação do potencial zeta dos lipoplexos EPOPC:Chol/ADN (condição controlo) e dos lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN. Ambos os complexos foram preparados às razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, como descrito no capítulo 2 – Materiais e Métodos. Os resultados apresentados (média  $\pm$  desvio padrão) são representativos de dois ensaios independentes.

Neste sentido, a avaliação do potencial zeta demonstra que apesar dos lipoplexos com lactosil-PE apresentarem uma menor carga superficial, e logo menos interações electroestáticas com a membrana celular carregada negativamente, apresentam níveis de ligação às células HepG2 superiores aos complexos controlo, mostrando que essa ligação não é de natureza electroestática mas sim, muito provavelmente, devida à interação dos complexos com os ASGP-Rs.

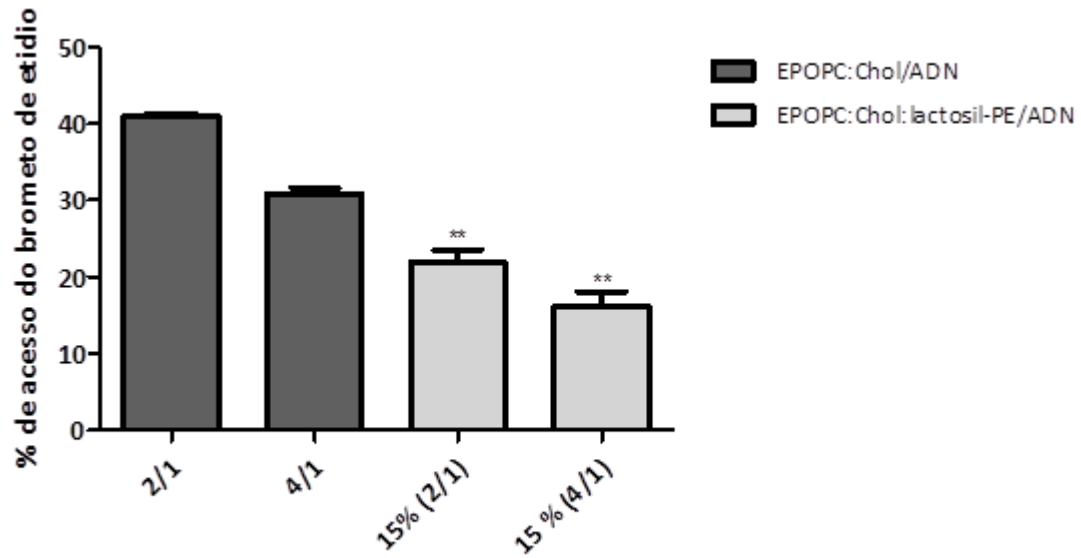
### **3.10.3 Avaliação da protecção do ADN pelos lipoplexos**

No sentido de avaliar a capacidade dos lipoplexos para complexarem o ADN que transportam e conseqüentemente conferirem-lhe protecção, de modo a este não ser degradado por nucleases presentes no soro, foi realizado o ensaio do brometo de etídio. Este ensaio utiliza uma molécula fluorescente de brometo de etídio, a qual apresenta capacidade de intercalar os ácidos nucleicos. Desta forma este método permite determinar o grau de acessibilidade ao ADN, na medida em que quanto maior for o grau de acesso ao ADN maior será a fluorescência emitida pelo brometo de etídio intercalado no material genético.

A Figura 22 mostra que a fluorescência emitida pelo brometo de etídio diminui com o aumento da razão de carga dos lipoplexos, ou seja, é possível verificar que lipoplexos com a mesma constituição lipídica mas preparados com diferentes razões de carga apresentam diferenças na capacidade para proteger o material genético, tendo-se observado uma maior protecção do ADN para os lipoplexos preparados na razão de carga mais elevada (+/-) (4/1) Este facto pode dever-se à maior condensação do material genético em complexos com maior número de cargas positivas, atingindo-se quase uma completa protecção do material genético transportado por estes sistemas. Relativamente aos lipoplexos preparados com um menor número de cargas positivas, como é o caso dos complexos preparados na razão de carga (+/-) 2/1, estes conferem uma menor protecção ao ADN, apresentando um menor grau de condensação do material genético, no entanto esta menor condensação pode facilitar a dissociação do material genético dos lipoplexos, levando a um aumento de transfecção destas formulações. (Faneca, et al., 2002; Mahato, et al., 1997)

Ainda pela Figura 22 é, também, passível de se verificar que os lipoplexos com lactosil-PE apresentam um maior grau de protecção do ADN em relação aos lipoplexos controlo (EPOPC:Chol/ADN), para ambas as razões de carga estudadas.

Neste sentido, a presença do lípido lactosil-PE nos lipoplexos, apesar de reduzir a sua carga superficial, pode alterar a sua estrutura, promovendo uma maior compactação do ADN e conseqüentemente uma maior protecção do material genético.



**Figura 22** – Avaliação do acesso do brometo de etídio ao ADN dos complexos. Os resultados (média ± desvio padrão de duplicados) são apresentados em percentagem do controlo (apenas ADN) e são representativos de três ensaios independentes. Os asteriscos (\*\*p <0,01) correspondem aos valores obtidos com os lipoplexos com 15% de lactosil-PE, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, que diferem significativamente dos obtidos com lipoplexos controlo (sem o lípido lactosil-PE) para as mesmas razões de carga.



## **4. CONCLUSÃO**





O hepatocarcinoma, o terceiro tipo de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial, é uma neoplasia hepática primária, afectando as principais células do fígado, os hepatócitos. No entanto, o fígado é um órgão que apresenta inúmeras funções no organismo chamando a atenção, ao longo dos anos, para o estudo de várias estratégias terapêuticas, incluindo a terapia génica. Este órgão apresenta uma particularidade bastante importante, da qual a terapia génica pode tirar partido para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas, nomeadamente a presença dos receptores de asialoglicoproteína, os quais são especificamente expressos nos hepatócitos e sobreexpressos em hepatócitos tumorais. Assim, vários estudos foram já realizados, utilizando diferentes sistemas para a entrega de fármacos ou material genético às células de hepatocarcinoma, no sentido de tentar encontrar sistema de transporte com elevada eficiência e especificidade para o HCC. Contudo, apesar do progresso que tem vindo a ser realizado nos últimos anos, ainda não foi encontrado um sistema suficientemente eficiente, específico e que contorne as barreiras associadas à entrega do material genético para este carcinoma.

Neste contexto, com este trabalho pretendeu-se desenvolver um novo sistema de transporte e entrega de material genético, de base lipídica, que tivesse a capacidade de promover uma entrega eficiente e específica de ácidos nucleicos às células de HCC. Para isso, gerou-se uma nova formulação de lipossomas catiónicos (EPOPC:Chol:lactosil-PE), contendo o lípido lactosil-PE, por forma a aumentar a especificidade dos complexos para as células de HCC, através da interação da galactose do lactosil-PE com os receptores de asialoglicoproteína, aumentando, consequentemente, a sua actividade biológica. As diferentes formulações, preparadas com várias percentagens de lactosil-PE e em diferentes razões de carga, foram sujeitas à análise de vários parâmetros, por forma a permitirem identificar a melhor formulação, tendo sido possível obter algumas conclusões:

A incorporação de lactosil-PE nos lipoplexos pode resultar numa potenciação substancial da sua actividade biológica em células de hepatocarcinoma, como é o caso da linha celular HepG2. Esta potenciação foi particularmente evidente para a formulação de lipoplexos (EPOPC:Chol:lactosil-PE/ADN) preparada com 15% de lactosil-PE, na razão de carga (+/-) 2/1, tendo sido verificada quer em termos dos níveis de expressão do transgene quer em termos da percentagem de células transfectadas.

Os resultados obtidos mostraram que esta potenciação da actividade biológica envolve a interação destes lipoplexos, EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) 2/1, com o receptor das asialoglicoproteínas, uma vez que a presença de galactose, que também tem capacidade de se

ligar a este receptor, induziu uma diminuição significativa dos níveis de transfecção desta formulação.

Os resultados dos ensaios de ligação e internalização celular permitiram também constatar o envolvimento do receptor das asialoglicoproteínas nestes dois passos do processo de transfecção realizada com os lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) 2/1, já que o aumento de ligação e internalização celular destes lipoplexos, face aos complexos controlo, é parcialmente abolido na presença de galactose.

A presença de soro reduziu significativamente a actividade biológica dos lipoplexos preparados com 15% de lactosil-PE, na razão de carga (+/-) 2/1, contudo os níveis obtidos foram muito superiores aos obtidos com as outras formulações estudadas.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que as formulações testadas, incluindo as preparadas com o lípido lactosil-PE, não afectaram de forma significativa a viabilidade celular.

A análise das propriedades físico-químicas permitiu concluir que a formulação de lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) 2/1, apresenta valores inferiores de carga superficial e diâmetro médio e níveis superiores de protecção de material genético aos obtidos com a formulação de lipoplexos controlo, preparada na mesma razão de carga mas sem lactosil-PE, mostrando que esta nova formulação com lactosil-PE tem propriedades físico-químicas mais adequadas sobretudo para aplicações in vivo.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o novo sistema de transporte e entrega do material genético, lipoplexos EPOPC:Chol:lactosil-PE(15%)/ADN (+/-) 2/1, apresenta potencial para ser utilizado no desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas de terapia génica para HCC.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Almofti, M. R. et al., 2003. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 410, p. 246–253.

Ansari, D. & Andersson, R., 2012. Radiofrequency ablation or percutaneous ethanol injection for the treatment of liver tumors. *World Journal of Gastroenterology*, Volume 18, pp. 1003–1008.

Aravalli, R. N., Cressman, E. N. K. & Steer, C. J., 2012. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Springer - Verlag*.

Blum, H. E., 2005. Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World Journal of Gastroenterology*, pp. 7391-7400.

Breitfeld, P. P. et al., 1985. Cell biology of the asialoglycoprotein receptor system: a model of receptor-mediated endocytosis. *International Review of Cytology*, pp. 47-95.

Brown, T. A., s.d. In: *Gene Cloning and DNA analysis. An introduction*. 5ª edição ed. s.l.:Blackwell Publishing.

Bruix, J. & Sherman, M., 2011. Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatology*, Volume 53, pp. 1020-1022.

Chiacchia, K. B. & Drickamer, K., 1984. Direct evidence for the transmembrane orientation of the hepatic glycoprotein receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 15440–15446.

Conner, S. D. & Schmid, S. L., 2003. Regulated portals of entry into the cell.. *Nature*, Volume 422, pp. 37-44.

Curley, S. A., 2001. Radiofrequency Ablation of Malignant Liver Tumors. *The oncologist*, Volume 6, pp. 14-23.

Di Stasi, A. et al., 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy.. *The New England Journal of Medicine*, Volume 365, pp. 1673-1683.

Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. & Sharp, P. A., 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 4, pp. 457-467.

Edelstein, M., Abedi, M. & Wixon, J., 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *The journal gene medicine*, Volume 9, pp. 833-842.

El-Aneed, A., 2004. Current strategies in cancer gene therapy.. *European Journal of Pharmacology*, Volume 498, pp. 1-8.

Elouahabi, A. & Ruyschaert, J. M., 2005. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Nature Molecular Therapy*, Volume 11, pp. 336-347.

Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J., 2006. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, Volume 6, pp. 259-269.

Faneca, H., Faustino, A. & Lima, M. C., 2008. Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes. *Journal of Controlled Release*, Volume 126, pp. 175-184.

Faneca, H., Simões, S. & Lima, M. C. P., 2002. Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1567, pp. 23-33.

Faneca, H., Simões, S. & Pedroso de Lima, C. M., 2004. Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum. *The Journal of Gene Medicine*, pp. 681-692.

Faneca, H., Simões, S. & Pedroso de Lima, M. C., 2004. Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum. *The Journal of Gene Medicine*, Volume 6, pp. 681-692.

Farazi, P. & DePinho, R., 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews/Cancer*, pp. 674-687.

Forner, A., Llovet, J. M. & Bruix, J., 2012. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, pp. 1245-1255.

Geffen, I. & Spiess, M., 1992. Asialoglycoprotein receptor. In: *Molecular Biology of receptors and transporters*. Basel-Switzerland: Academic Press Inc., pp. 181-219.

Gomaa, A. I. et al., 2008. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and. *World Journal of Gastroenterology*, Volume 14, pp. 4300-4308.

Gramantieri, L. et al., 2008. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, Volume 12, pp. 2189-2204.

Guinn, B. & Mulherkar, R., 2008. International progress in cancer gene therapy.. *Nature Cancer Gene therapy*, Volume 15, pp. 765-775.

Ishibashi, H. et al., 2009. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol*, Volume 31, pp. 399-409.

Izquierdo, M., 2005. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, Volume 12, pp. 217-227.

Kaneko, S. et al., 1995. Adenovirus-mediated Gene Therapy of Hepatocellular Carcinoma Using Cancer specific Gene Expression. *Cancer research*, Volume 55, pp. 5283-5287.

Khazanov, E., Simberg, D. & Barenholz, Y., 2006. Lipoplexes prepared from cationic liposomes and mammalian DNA induce CpG-independent, direct cytotoxic effects in cell cultures and in mice. *The Journal of Gene Medicine*, pp. 998-1007.

Khorev, O. et al., 2008. Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, p. 5216.

Kota, J. et al., 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, Volume 137, pp. 1005-1017.

Leventis, R. & Silvius, J. R., 1990. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 124-132.



Lila, A., Ishida, T. & Kiwada, H., 2010. Targeting Anticancer Drugs to Tumor Vasculature Using Cationic Liposomes. *Pharmaceutical Research*, pp. 1171-1183.

Li, Y., Tang, Z.-Y. & Hou, J.-X., 2012. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. *Nature Reviews Gastroenterology&Hepatology*, pp. 32-43.

Lopez, S. & Arias, C. F., 2010. How Viruses Hijack Endocytic Machinery. *Nature Education*, Volume 3, p. 16.

Ma, B. et al., 2007. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *Journal of Controlled Release* , Volume 123, pp. 184-194.

Mahato, R. I., Rolland, A. & Tomlinson, E., 1997. Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research*, Volume 14, pp. 853-859.

McCormick, F., 2001. CANCER GENE THERAPY: FRINGE OR CUTTING EDGE?. *Nature Reviews Cancer*, Volume 1, pp. 130-141.

McPhaul, M. & Berg, P., 1986. Formation of functional asialoglycoprotein receptor after transfection with cDNAs encoding the receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 8863–8867.

Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. & Hamm-Alvarez, S., 2005. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Therapy*, Volume 12, pp. 1734-1751.

Morgan, R. A., 2012. Live and Let Die: A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic. *Molecular Therapy*, Volume 20, pp. 11-13.

Morille, M. et al., 2008. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer.. *Biomaterials*, Volume 29, pp. 3477-3496.

Mulligan, R. C., 1993. The basic science of gene therapy. *Science*, Volume 260, pp. 926-932.

Natsume, A. & Yoshida, J., 2008. Gene therapy for high-grade glioma. *Cell Adhesion & Migration*, Volume 2, pp. 186-191.

Noguchi, A., Furuno, T., Kawaura, C. & Nakanishi, M., 1998. Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *The Journal for rapid publication of short reports in molecular biosciences*, pp. 169-173.

Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S., 2005. Design and development of polymers. *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 4, pp. 581-593.

Paecharoenchai, O. et al., 2012. Structure Relationship of Cationic Lipids on Gene Transfection Mediated by cationic liposomes. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, pp. 1302-1308.

Paradis, V. et al., 2009. Hepatocellular Carcinomas in Patients With Metabolic Syndrome Often Develop Without Significant Liver Fibrosis: A Pathological Analysis. *Hepatology*, Volume 49, pp. 851-859.

Park, J. et al., 2012. A review of RGD-functionalized nonviral gene delivery vectors for cancer therapy. *Nature Cancer Gene Therapy*, Volume 19, pp. 741-748.

Parton, R. G. & Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 8, pp. 185-194.

Pathak, A., Patnaik, S. & Gupta, K., 2009. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology Journal*, pp. 1559-1572.

Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Pires, P. & Faneca, H., 2001. Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 47, p. 277–294.

Ram, I. M., 2005. Water insoluble and soluble lipids for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 699-712.

Resina, S., Prevot, P. & Thierry, A. R., 2009. Physico-Chemical Characteristics of Lipoplexes Influence Cell Uptake Mechanisms and Transfection Efficacy. *PLOS ONE*, Volume 4, pp. 1-11.

Sangro, B. et al., 2010. A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Therapy*, Volume 17, pp. 837-843.

Sheridan, C., 2011. Gene therapy finds its niche.. *Nature Biotechnology*, Volume 29, pp. 121-128.

Simões, S. et al., 2005. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opinion Drug Delivery*, Volume 2, pp. 237-254.

Singhal, A., Jayaraman, M., Dhanasekaran, D. N. & Kohli, V., 2012. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: Predictive tools for prognosis and recurrence. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 82, pp. 116-140.

Sorensen, A. L. T., Clausen, H. & Wandall, H. H., 2012. Carbohydrate clearance receptors in transfusion medicine. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1799-1800.

Spiess, M., 1990. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*, pp. 10009-10018.

Spiess, M. & Lodish, H. F., 1985. Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 6465–6469.

Templeton, N. S., 2009. Nonviral Delivery for Genomic Therapy of Cancer. *World Journal of Surgery*, Volume 33, pp. 685-697.

Tong, A. W. & Nemunaitis, J., 2008. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?. *Cancer Gene Therapy*, Volume 15, pp. 341-355.

Ueno, S. et al., 2011. Asialoglycoprotein Receptor Promotes Cancer Metastasis by Activating the EGFR–ERK Pathway. *Cancer Research*, p. 6419.

Venook, A. P., Papandreou, C., Furuse, J. & Guevara, L. L., 2010. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *The Oncologist*, Volume 15, pp. 5-13.

Wang, T., Upponi, J. R. & Torchilin, V. P., 2012. Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 427, pp. 3-20.

Weis, W. I. & Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, pp. 441-473.

Wu, J. et al., 1998. Increased Liver Uptake of Liposomes and Improved Targeting Efficacy by Labeling With Asialofetuin in Rodents. *Hepatology*, Volume 27, pp. 772-778.

Wu, Y. et al., 2011. MicroRNA Delivery by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, Volume 8, pp. 1381-1389.

Xu, Y. & Szoka, F. C., 1996. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, p. 5616.

Yamadaa, M. et al., 2012. Controlled formation of heterotypic hepatic micro-organoids in anisotropic hydrogel microfibers for long-term preservation of liver-specific functions. *Biomaterials*, Volume 33, p. 8304–8315.

Zhang, X.-X., McIntosh, T. J. & Grinstaff, M. W., 2012. Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie*, Volume 94, pp. 42-58.

Zhao, X., Elmore, L., Harris, C. & Wang, X., 2011. Hepatocellular Carcinoma. *eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Genetics&Disease*, pp. 1-7.

cancro, A. I. p. p. n., 2008. *Globocan base de dados*. [Online] Available at: [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr)