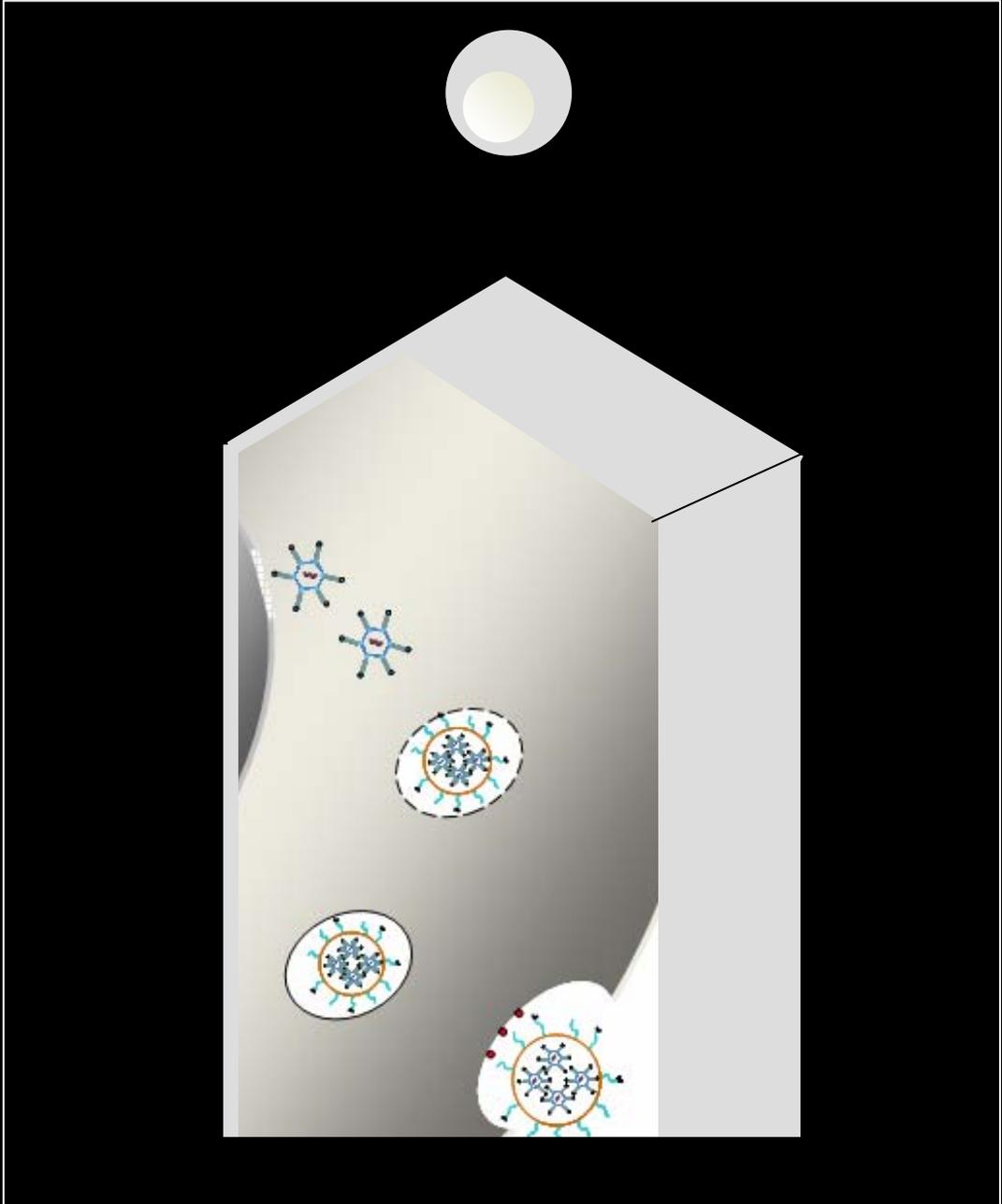


TERAPIA GÉNICA PARA DOENÇAS VASCULARES: DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VECTORES PARA A ENTREGA INTRACELULAR DE GENES DE FACTORES ANGIOGÉNICOS



ANA CRISTINA DA SILVA FILIPE

TERAPIA GÉNICA PARA DOENÇAS VASCULARES:
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VECTORES PARA
A ENTREGA INTRACELULAR DE GENES
DE FACTORES ANGIOGÉNICOS

ANA CRISTINA DA SILVA FILIPE

FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
2008

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra para prestação de provas de doutoramento em Farmácia,
na especialidade de Tecnologia Farmacêutica.

ÍNDICE

OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	13
--	----

SUMÁRIO.....	15
--------------	----

ABSTRACT	23
----------------	----

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL	31
------------------------	----

1.1. TERAPIA GÉNICA E DOENÇAS VASCULARES	33
1.1.1. <i>Vectores disponíveis em terapia génica</i>	34
1.1.1.1. <i>Vectores não virais</i>	35
1.1.1.2. <i>Vectores virais</i>	38
1.1.2. <i>Novas abordagens terapêuticas de patologias envolvendo o endotélio vascular</i>	43
1.1.2.1. <i>Inibição da angiogénese tumoral</i>	43
1.1.2.2. <i>Indução da angiogénese</i>	44
1.1.2.3. <i>Terapia anti-inflamatória</i>	45
1.1.3. <i>Concepção de nanotransportadores de material genético direccionados para células endoteliais vasculares: factores condicionantes da administração intravenosa</i>	47
1.1.3.1. <i>Interações não específicas com proteínas</i>	47
1.1.3.2. <i>Interações não específicas com células</i>	47
1.1.3.3. <i>Biodistribuição de lipossomas</i>	48
1.1.3.4. <i>Interação com células alvo</i>	49
1.1.3.5. <i>Vias de internalização celular</i>	51
1.1.3.6. <i>Libertação dos endossomas</i>	52
1.1.3.7. <i>Degradação após libertação do endossoma</i>	53
1.1.3.8. <i>Entrada no núcleo</i>	53
1.1.3.9. <i>Dissociação dos lípidos, polímeros e descapsidação</i>	55
1.1.3.10. <i>Mecanismos moleculares de silenciamento dos transgenes</i>	56
1.1.3.11. <i>Processamento da transcrição</i>	57
1.1.3.12. <i>Indução de resposta imunitária</i>	57
1.1.4. <i>Características essenciais do transportador de genes</i>	58
1.2. BIBLIOGRAFIA.....	59

CAPÍTULO 2

2. DESENVOLVIMENTO DE NANOTRANSPORTADORES PARA ENTREGA DIRECCIONADA DE TRANSGENES A CÉLULAS HUMANAS	69
---	----

2.1. INTRODUÇÃO.....	71
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.2.1. <i>Purificação do ADN plasmídico</i>	74
2.2.2. <i>Preparação de poliplexos</i>	75
2.2.3. <i>Medição dos tamanhos</i>	75
2.2.4. <i>Acessibilidade do brometo de etídio ao ADN</i>	75
2.2.5. <i>Efeito tampão mediado por PEI</i>	76
2.2.6. <i>Determinação da eficiência de transfecção mediada por poliplexos</i>	76
2.2.7. <i>Métodos de quantificação de ADN plasmídico em lipopoliplexos</i>	76
<i>Marcação do ADN com ³⁵S dATP</i>	76

	<i>Marcação do ADN com a sonda Cy3</i>	77
	<i>Quantificação do ADN após dissociação dos poliplexos de PEI/ADN utilizando PMAA</i>	78
2.2.8.	<i>Remoção de ADN plasmídico não associado aos lipossomas</i>	81
	<i>Eficiência da coluna de Sefarose CL-4B</i>	81
	<i>Utilização da coluna de Sefarose CL-4B seguida de ultra-centrifugação</i>	81
2.2.9.	<i>Métodos de preparação de LPPX para determinação da eficiência de recuperação do ADN</i>	81
2.2.10.	<i>Efeito do método REV/FT na integridade e actividade do plasmídeo</i>	82
	<i>Efeito do éter na integridade e actividade do plasmídeo</i>	82
	<i>Efeito do método “congelamento/descongelamento” na actividade de transfecção de poliplexos</i>	83
2.2.11.	<i>Preparação de LPPX direccionados para avaliação da interacção celular</i>	83
	<i>Procedimento A</i>	83
	<i>Procedimento B</i>	85
	<i>Procedimento C</i>	86
2.2.12.	<i>Preparação de lipossomas vazios conjugados com NHS-PEG-Mal para análise da associação celular</i>	87
2.2.13.	<i>Quantificação do colesterol</i>	88
2.2.14.	<i>Quantificação da transferrina</i>	88
2.2.15.	<i>Efeito da razão 2-iminotiolano/transferrina na sua eficiência de activação</i>	89
2.2.16.	<i>Remoção da transferrina não acoplada</i>	89
2.2.17.	<i>Quantificação da proteína celular</i>	90
2.2.18.	<i>Cultura celular</i>	90
2.2.19.	<i>Determinação da expressão da transferrina</i>	90
2.2.20.	<i>Associação celular</i>	91
	<i>Microscopia de fluorescência e confocal (LP e LPPX)</i>	91
	<i>Citometria de fluxo (LP)</i>	91
2.2.21.	<i>Transfecção mediada por LPPX direccionados</i>	92
2.2.22.	<i>Detecção e quantificação da β-galactosidase</i>	92
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
2.3.1.	<i>Caracterização de poliplexos compostos por PEI/ADN</i>	93
	<i>Tamanho dos poliplexos</i>	93
	<i>Protecção do ADN com base no teste da acessibilidade do brometo de etídio</i>	97
	<i>Efeito tampão mediado por PEI</i>	98
	<i>Eficiência de transfecção mediada por poliplexos em função da razão N/P</i>	99
2.3.2.	<i>Encapsulação de poliplexos compostos por PEI/ADN em lipossomas</i>	100
	<i>Métodos de quantificação de ADN plasmídico em lipopoliplexos</i>	100
	<i>Purificação de lipopoliplexos em coluna de Sefarose CL-4B</i>	107
	<i>Métodos de preparação dos lipopoliplexos: Factores que influenciam a eficiência de recuperação do ADN</i>	108
	<i>Efeito do método REV/FT na integridade e na actividade do ADN</i>	111
2.3.3.	<i>Acoplamento da transferrina</i>	114
	<i>Eficiência da activação da transferrina</i>	114
	<i>Avaliação dos parâmetros de formulação na eficiência de acoplamento da transferrina</i>	115
	<i>Substituição da molécula de DSPE-PEG-Mal por NHS-PEG-Mal</i>	117
2.3.4.	<i>Estudos de associação celular</i>	119
	<i>Efeito da remoção de PEI adsorvido na associação celular dos lipopoliplexos</i>	121
2.3.5.	<i>Actividade de transfecção dos lipossomas contendo poliplexos</i>	125
2.4.	BIBLIOGRAFIA	127

CAPÍTULO 3

3. ENTREGA ESPECÍFICA DE POLIPLEXOS A CÉLULAS ENDOTELIAIS ACTIVADAS MEDIADA POR LIPOSSOMAS DIRECCIONADOS.....	131
3.1. INTRODUÇÃO.....	133
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	134
3.2.1. Preparação do anticorpo H18/7.....	134
3.2.2. Preparação de imunolipossomas contendo poliplexos, de imunolipossomas vazios e de misturas de imunolipossomas vazios com poliplexos.....	134
3.2.3. Preparação de lipoplexos.....	135
3.2.4. Quantificação do colesterol.....	135
3.2.5. Quantificação do anticorpo acoplado.....	135
3.2.6. Cultura celular.....	136
3.2.7. Expressão da E-selectina e do receptor da transferrina à superfície das células endoteliais.....	136
3.2.8. Estudos de associação celular com imunolipossomas vazios e com imunolipossomas contendo poliplexos.....	137
3.2.9. Estudos de transfecção.....	137
3.2.10. Quantificação da expressão da β -galactosidase.....	138
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	138
3.3.1. Factores condicionantes da interacção entre imunolipossomas e as células alvo.....	138
<i>Extensão da expressão da E-selectina à superfície das células</i>	138
<i>Eficiência de acoplamento do anticorpo H18/7</i>	139
<i>Concentração de lípido</i>	140
<i>Tamanho dos lipossomas e composição lipídica</i>	141
<i>Efeito da associação de poliplexos a imunolipossomas</i>	143
3.3.2. Actividade de transfecção dos imunolipossomas contendo poliplexos.....	144
3.3.3. Permissividade das células endoteliais à transfecção mediada por lipoplexos.....	148
3.4. BIBLIOGRAFIA.....	152

CAPÍTULO 4

4. ENTREGA DE VÍRUS ADENO-ASSOCIADOS A CÉLULAS ENDOTELIAIS ACTIVADAS MEDIADA POR LIPOSSOMAS DIRECCIONADOS.....	155
4.1. INTRODUÇÃO.....	157
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	161
4.2.1. Quantificação de rAAV.....	161
4.2.2. Métodos de purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAAV.....	163
4.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação.....	164
4.2.4. Preparação de lipossomas direccionados contendo rAAV.....	165
4.2.5. Preparação de misturas de lipossomas e de rAAV.....	165
4.2.6. Culturas celulares.....	166
4.2.7. Associação celular de lipossomas direccionados.....	166
4.2.8. Estudos de transdução.....	166
4.2.9. Quantificação da expressão da β -galactosidase.....	167
4.2.10. Associação celular de genomas virais.....	167
4.3. RESULTADOS.....	168
4.3.1. Optimização de factores críticos relacionados com a encapsulação de rAAV em lipossomas.....	168
<i>Desenvolvimento de métodos de purificação de lipossomas contendo rAAV</i>	168
<i>Determinação da eficiência de encapsulação</i>	170
4.3.2. Eficiência de transdução de lipossomas contendo rAAV, direccionados para o receptor da transferrina.....	171

<i>Associação celular mediada por lipossomas direccionados</i>	171
<i>Estudos de transdução</i>	172
4.3.3. <i>Actividade de transdução de lipossomas contendo rAAV, direccionados para a E-selectina</i>	175
<i>Associação celular mediada por lipossomas direccionados</i>	175
<i>Eficiência de transdução mediada por lipossomas direccionados</i>	176
4.3.4. <i>Modulação da transdução de células HEK-293 mediada por misturas de rAAV e lipossomas</i>	177
4.3.5. <i>Permissividade das células HUVEC à transdução mediada por rAAV</i>	181
4.4. BIBLIOGRAFIA	187

CAPÍTULO 5

5. ENTREGA ESPECÍFICA DE VECTORES ADENOVIRAIS A CÉLULAS ENDOTELIAIS ACTIVADAS MEDIADA POR LIPOSSOMAS DIRECCIONADOS	191
5.1. INTRODUÇÃO	193
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	197
5.2.1. <i>Produção de vectores adenovirais</i>	197
5.2.2. <i>Produção do anticorpo H18/7</i>	198
5.2.3. <i>Preparação de imunolipossomas contendo vectores adenovirais e imunolipossomas vazios</i>	198
<i>Purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAd por gradientes de Ficoll e de cloreto de cézio</i>	199
5.2.4. <i>Efeito das condições experimentais na viabilidade dos vectores e avaliação da cinética da perda de actividade</i>	200
5.2.5. <i>Preparação de misturas de adenovírus recombinantes/imunolipossomas</i>	201
5.2.6. <i>Caracterização dos lipossomas</i>	201
<i>Determinação do tamanho</i>	201
<i>Determinação da eficiência de encapsulação</i>	202
<i>Eficiência de acoplamento do ligando</i>	202
5.2.7. <i>Estudos de associação celular</i>	202
5.2.8. <i>Estudos de transdução</i>	203
5.2.9. <i>Avaliação da associação celular e da expressão do transgene</i>	204
5.2.10. <i>Viabilidade celular</i>	204
5.3. RESULTADOS	205
5.3.1. <i>Avaliação de factores críticos na preparação de lipossomas</i>	205
<i>Processos de purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAd</i>	205
<i>Condições de acoplamento: efeito da temperatura e tempo pós-descongelação</i>	207
<i>Método de preparação por mistura de lipossomas pré-formados</i>	210
5.3.2. <i>Transdução de células endoteliais activadas mediada por imunolipossomas com 200 nm de diâmetro</i>	212
<i>Estudos de associação celular</i>	212
<i>Estudos de transdução</i>	215
<i>Estabelecimento da curva dose/resposta</i>	217
<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	219
5.3.3. <i>Mecanismos celulares envolvidos na entrega direccionada de vectores adenovirais mediada por imunolipossomas</i>	221
<i>Efeito da temperatura na internalização celular dos imunolipossomas</i>	221
<i>Efeito do excesso de H18/7 livre nos níveis de transdução</i>	222
5.4. DISCUSSÃO	223
5.5. BIBLIOGRAFIA	228

CAPÍTULO 6

6. AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA EFICÁCIA DE ENTREGA DE IMUNOLIPOSSOMAS CONTENDO ADENOVÍRUS A CÉLULAS ENDOTELIAIS ACTIVADAS	231
6.1. INTRODUÇÃO.....	233
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	234
6.2.1. <i>Interação entre proteínas do soro com vectores adenovirais-:análise por Western blot</i>	<i>234</i>
6.2.2. <i>Preparação de imunolipossomas contendo rAd</i>	<i>235</i>
6.2.3. <i>Modelo animal de dermatite de contacto alérgica</i>	<i>236</i>
6.2.4. <i>Administração dos imunolipossomas.....</i>	<i>236</i>
6.2.5. <i>Influência das proteínas séricas na neutralização dos rAd e extensão do desenvolvimento de anticorpos contra as proteínas virais</i>	<i>236</i>
6.2.6. <i>Cultura celular.....</i>	<i>237</i>
6.2.7. <i>Avaliação da transdução in vivo.....</i>	<i>237</i>
6.3. RESULTADOS	239
6.3.1. <i>Interação entre os rAd e as proteínas do soro de ratinho.....</i>	<i>239</i>
6.3.2. <i>Eficiência de transdução in vivo mediada por imunolipossomas contendo rAd.....</i>	<i>241</i>
6.3.3. <i>Resposta do sistema imunitário aos rAd encapsulados em imunolipossomas</i>	<i>243</i>
6.4. BIBLIOGRAFIA.....	247

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	251
--	------------

ABREVIATURAS	I
---------------------------	----------

AGRADECIMENTOS	IX
-----------------------------	-----------

OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O principal objectivo do trabalho apresentado nesta dissertação consistiu no desenvolvimento de um nanotransportador de base lipídica, que permitisse o transporte e entrega de genes especificamente a células endoteliais afectadas em determinadas patologias (células endoteliais activadas), exibindo, simultaneamente, características adequadas para administração intravenosa.

Como objectivos específicos salientam-se:

- Garantir elevada eficiência de associação dos vectores plasmídicos e dos vectores virais ao nanotransportador;
- Garantir protecção dos vectores plasmídicos contra a degradação enzimática, no decorrer do processo de entrega de genes;
- Identificar e otimizar procedimentos experimentais adequados à preparação e purificação dos sistemas desenvolvidos;
- Conferir propriedades físico-químicas adequadas (carga de superfície e tamanho) para administração intravenosa;
- Desenvolver e otimizar processos de acoplamento covalente de ligandos (nomeadamente o anticorpo H18/7) à superfície dos nanotransportadores, de modo a promover o seu direccionamento para células endoteliais activadas;
- Garantir expressão específica do transgene quer em modelos celulares quer em modelos animais de patologias envolvendo células endoteliais;
- Identificar mecanismos pelos quais os nanotransportadores desenvolvidos medeiam a entrega intracelular do transgene.

A dissertação que a seguir se apresenta encontra-se estruturada em 7 capítulos.

O **Capítulo 1** consiste numa introdução temática organizada em 4 secções principais, que correspondem às diferentes áreas científicas em que se insere o trabalho, e por último a bibliografia correspondente. Neste capítulo, são referidas as principais características dos vectores actualmente disponíveis em terapia génica, as principais abordagens terapêuticas envolvendo células endoteliais, assim como as suas limitações, e as principais características que os transportadores de genes deverão apresentar em função das principais barreiras inerentes à utilização da via de administração intravenosa.

Esta introdução temática foi elaborada a partir de uma revisão cuidada da literatura mais relevante existente sobre cada uma das áreas referidas.

O trabalho experimental é descrito num total de 5 capítulos (Capítulos 2 a 6) organizados nas seguintes secções: Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão e por último Bibliografia.

No **Capítulo 2** procedeu-se à concepção e optimização de uma formulação com base nos pressupostos apresentados no Capítulo 1, tendo como resultado a obtenção de um nanotransportador de ADN plasmídico caracterizado pelo direccionamento para células apresentando receptores de transferrina. Essa formulação constituiu a base para o trabalho de investigação apresentado no **Capítulo 3**, que teve por objectivo a adaptação do transportador desenvolvido para direccionamento específico de genes para células endoteliais activadas, visando a sua aplicação em terapia génica de patologias vasculares. Os resultados obtidos nesse capítulo estiveram na origem de uma alteração significativa na formulação desenvolvida, no sentido de permitir a encapsulação de vectores virais, em alternativa aos plasmídeos de ADN. Deste modo, no **Capítulo 4** procedeu-se à optimização de nanotransportadores direccionados, encapsulando vectores virais adeno-associados (rAAV), conhecidos por induzirem elevados níveis de transdução em vários tipos de células. Os resultados obtidos neste capítulo sugerem que as células endoteliais não são permissivas à transdução mediada por rAAV, provavelmente consequência de limitações de internalização celular e/ou de processamento intracelular deste tipo de vector viral. Face a esses resultados, optou-se, no **Capítulo 5**, por proceder à substituição dos rAAV por vectores adenovirais (rAd), conhecidos pela sua eficiência em transduzir células endoteliais. A incorporação destes vectores nos nanotransportadores desenvolvidos permitiu o seu direccionamento para células endoteliais activadas, as quais mimetizam as células endoteliais afectadas em determinadas patologias. Após obtenção destes resultados procedeu-se à análise da eficiência dessa formulação *in vivo*, conforme exposto no **Capítulo 6**.

Finalmente, no **Capítulo 7** são sistematizadas as conclusões mais relevantes decorrentes da apresentação e discussão dos resultados inerentes a cada um dos capítulos anteriormente referidos, bem como enunciadas as perspectivas futuras para a utilização dos nanotransportadores desenvolvidos.

SUMÁRIO

Os avanços efectuados na área da biologia molecular resultaram num novo conceito de tratamento de doenças, o conceito de terapia génica, o qual pode ser definido como qualquer estratégia de tratamento que se baseie na introdução de polinucleótidos em células humanas, com objectivos terapêuticos. Neste contexto, as células do endotélio vascular constituem um alvo importante em termos terapêuticos, uma vez que se encontram envolvidas em inúmeras patologias, tais como cancro, doenças inflamatórias e em patologias que decorrem com eventos isquémicos. A entrega de genes adequados a estas células poderá modelar a progressão das referidas patologias, surgindo como uma terapia alternativa ou de utilização concomitante com as estratégias de tratamento actualmente disponíveis. Com efeito, apesar dos avanços recentes, estas continuam a apresentar limitações no tratamento das referidas condições patológicas.

Neste âmbito, a inibição da angiogénese tem demonstrado ser uma estratégia importante no controlo do crescimento tumoral, uma vez que a formação de novos vasos sanguíneos constitui um requisito crítico para o crescimento das células tumorais. Assim, na ausência de um sistema vascular, a maioria dos tumores é incapaz de se expandir, permanecendo sem capacidade de invasão e de metastizar. Contrariamente, a promoção da angiogénese em patologias que decorrem com eventos isquémicos baseia-se na formação de novos vasos, sob influência de genes codificando factores de crescimento adequados.

Noutro contexto, a inibição de genes codificando moléculas de adesão ou citocinas inflamatórias poderá desempenhar uma função importante na terapêutica anti-inflamatória, assim como a estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4).

A entrega de genes terapêuticos nas situações anteriormente referidas, especificamente em áreas onde é necessária a sua expressão, constitui o principal desafio na aplicação clínica da terapia génica. Este desafio poderá ter como solução o desenvolvimento de sistemas adequados (em termos de segurança e eficiência) para administração intravenosa, os quais deverão apresentar capacidade de discriminar entre células endoteliais no estado fisiológico e as mesmas células no estado patológico, consistindo este o âmbito da presente dissertação.

Dos vectores actualmente disponíveis, os vectores não virais, particularmente os plasmídeos, são considerados dos mais seguros. Os plasmídeos convencionais não apresentam capacidade de replicar em células de mamífero, daí resultando a expressão transitória do transgene, facto que condiciona a sua utilização a patologias que requerem expressão transitória da proteína terapêutica. Um dos métodos padrão utilizados para transferência do ADN plasmídico a células inclui a complexação com poliacetatos, nomeadamente com o polímero polietilenimina (PEI). Este polímero apresenta propriedades que permitem simultaneamente condensar o ADN e facilitar a sua saída do endossoma, etapas, que à luz do conhecimento actual, são determinantes para a eficácia do processo de transfecção. Estas propriedades devem-se essencialmente ao facto do polímero possuir uma densidade de grupos amina bastante elevada, os quais se encontram apenas parcialmente protonados ao pH fisiológico. Após internalização nas células, e aquando do processo de acidificação que ocorre nos endossomas, os protões são captados pelos grupos amina do polímero PEI, impedindo a diminuição do pH naquele organelo celular. Deste modo, continua a verificar-se a entrada de protões, a qual é acompanhada do influxo de iões cloreto. O movimento deste ião induz o influxo de água, causando turgidez osmótica, e subsequente ruptura do endossoma, permitindo assim que os poliplexos escapem para o citosol. Por este motivo, o polímero PEI é frequentemente designado por esponja de protões, característica que lhe confere o efeito tampão. A sua estrutura ramificada, contendo aminas primárias, secundárias e terciárias, confere-lhe o atributo de exercer o efeito tampão ao longo de uma vasta gama de valores de pH.

A eficácia de transfecção *in vitro* mediada pelos poliplexos compostos por PEI e ADN criou grandes expectativas para a sua utilização em terapia génica. No entanto, à semelhança do que se encontra descrito para lipossomas catiónicos, a presença de cargas positivas à superfície dos complexos é um factor limitativo à sua administração *in vivo*, nomeadamente através da via intravenosa. De modo a ultrapassar as limitações associadas aos sistemas catiónicos, nomeadamente à sua interacção não específica com células e proteínas séricas, optou-se, neste trabalho, por tentar mascarar a carga dos poliplexos de PEI/ADN através da associação a lipossomas neutros e/ou negativos, originando os lipopoliplexos (LPPX). Adicionalmente, optou-se pela introdução do polímero polietilenoglicol (PEG) na composição da formulação, na expectativa de aumentar significativamente o tempo de circulação sanguínea do transportador. O tamanho dos nanotransportadores resultantes foi modulado por extrusão, esperando-se

uma estabilidade elevada, como consequência da ausência de lípidos de carga positiva, da presença de PEG e das suas dimensões reduzidas. Na expectativa de conferir selectividade aos transportadores não catiónicos conjugados com PEG, procedeu-se à inclusão de ligandos neste sistema, no sentido de promover a interacção com as células alvo. Esta interacção deve caracterizar-se por uma elevada afinidade, e induzir a internalização celular dos transportadores. Uma vez internalizados espera-se que estes sejam libertados do endossoma para o citosol, evitando deste modo a degradação no lisossoma. Especula-se que o trajecto dos transgenes até ao núcleo deva ocorrer na forma de complexos (por exemplo, complexos de PEI/ADN) para evitar a degradação citoplasmática do material genético. A entrada do transgene no núcleo constitui um parâmetro crítico em terapia génica, principalmente para vectores não virais. Neste âmbito, apesar da estratégia mais vulgarmente utilizada consistir na incorporação de sequências de localização nuclear (NLS), a utilização do polímero PEI também poderá desempenhar um papel importante, promovendo a protecção do ADN e facilitando a sua translocação para o núcleo.

Após internalização nuclear, a extensão e duração da expressão do transgene dependerá da construção do plasmídeo e da dissociação do complexo.

A primeira etapa deste trabalho, descrita no Capítulo 2 desta dissertação, consistiu no desenvolvimento da formulação e sua optimização. A preparação do nanotransportador decorre em três fases. Na primeira fase o ADN é complexado com o PEI, na segunda fase os poliplexos resultantes são associados a lipossomas neutros e/ou negativos e, finalmente, procede-se ao acoplamento do polímero PEG aos LPPX, seguindo-se o acoplamento do ligando transferrina ao terminal das moléculas de PEG. Na primeira fase do desenvolvimento desta formulação efectuou-se a caracterização dos poliplexos a associar aos lipossomas, nomeadamente em termos de tamanho, capacidade tampão e actividade de transfecção. Paralelamente, procedeu-se ao desenvolvimento e caracterização de vários métodos de quantificação do ADN, possibilitando, na segunda etapa determinar as condições experimentais mais eficientes para recuperação de ADN associado aos lipossomas. Na terceira etapa, correspondendo ao acoplamento do ligando transferrina às moléculas de PEG, avaliou-se o efeito da presença de diferentes concentrações do polímero PEI neste parâmetro, assim como a utilização de diferentes tipos e quantidades de PEG reactivo.

Os resultados da interacção celular dos lipopoliplexos desenvolvidos demonstraram que estes apresentam a capacidade de reconhecer células que expressam receptores de

transferrina, embora a sua actividade de transfecção se tenha revelado claramente aquém do esperado.

Após a referida optimização da formulação e demonstração do conceito pretendido (selectividade de interacção com células alvo), procedeu-se à avaliação do potencial da formulação para aplicação em patologias envolvendo células endoteliais activadas. Para tal, utilizou-se um ligando apropriado ao novo alvo celular, um anticorpo desenvolvido contra a E-selectina humana. O modelo celular utilizado teve como base a activação das Células Endoteliais Humanas da Veia do Cordão Umbilical (HUVEC) com mediadores inflamatórios, como o TNF- α (factor de necrose tumoral- α). Dessa activação resulta a sobre-expressão de várias glicoproteínas de superfície, nomeadamente da E-selectina, mimetizando a activação endotelial que ocorre nas patologias anteriormente referidas, nomeadamente cancro, doenças inflamatórias e patologias que decorrem com isquémia.

Foram identificados alguns parâmetros, tais como concentração lipídica e tamanho das partículas, que podem influenciar a extensão da associação dos nanotransportadores às células alvo. Os resultados obtidos demonstraram que, apesar da elevada eficiência de associação do ADN aos nanotransportadores, e da elevada extensão de associação destes às células endoteliais activadas, os níveis de expressão do transgene não são detectáveis. A utilização de formulações controlo, nomeadamente lipossomas catiónicos, constituíram um indício da baixa “permissividade” das células endoteliais face à transfecção mediada por plasmídeos de ADN.

No seu conjunto, os resultados apresentados não permitem esclarecer se a ineficiência de transfecção observada com os imunolipossomas (lipossomas em que o ligando é um anticorpo) contendo poliplexos é consequência da ineficiente entrega de ADN às células alvo, e/ou se tal resulta da falta de permissividade das células endoteliais à transfecção envolvendo ADN plasmídico, devido a limitações pós-internalização celular.

Na tentativa de ultrapassar a ineficiência global observada no processo de transfecção, considerou-se a possibilidade da substituição dos vectores plasmídicos por vectores virais, reconhecidos pela elevada eficiência em transduzir uma grande variedade de células.

A hipótese colocada nesta fase do trabalho foi a de que a encapsulação de vectores adeno-associados em lipossomas resultaria em elevados níveis de expressão do transgene nas células alvo, como consequência: (i) da eficiência dos vectores virais, e

(ii) da especificidade de entrega dos vectores virais mediada por lipossomas direccionados.

Os vectores adeno-associados (rAAV) são vectores de cadeia simples de ADN, que entram nas células por intermédio de moléculas de heparano existentes na superfície celular. Após transporte no citoplasma e internalização nuclear, o ADN de cadeia simples é convertido em ADN de cadeia dupla. Estes vectores são responsáveis pela expressão a longo termo do transgene, nomeadamente em fibras musculares *in vivo*.

Após determinação dos métodos mais eficazes na remoção dos rAAV não associados aos imunolipossomas, e na eficiência de encapsulação, procedeu-se ao direccionamento da formulação resultante, quer para células apresentando receptores de transferrina, quer para células endoteliais activadas, utilizando os ligandos apropriados. Ambas as estratégias demonstraram eficiência de reconhecimento das respectivas células alvo, embora se revelassem ineficientes do ponto de vista da transdução. A ausência de transdução poderá resultar da entrega insuficiente de rAAV às células, como consequência quer do baixo título das preparações de rAAV (que resulta numa baixa eficiência de encapsulação), quer da baixa extensão de associação dos lipossomas às células alvo (particularmente no caso dos lipossomas com transferrina). Independentemente destes factores, a hipótese segundo a qual a elevada eficiência de transdução que caracteriza estes vírus seria suficiente para induzir expressão do transgene após associação a lipossomas, não se verificou. Não é de excluir que os rAAV tenham sido processados por vias intracelulares que inviabilizem a sua actividade, sendo que, no caso das células HUVEC, não se pode rejeitar a hipótese de que estas sejam ineficientes na transformação do ADN de cadeia simples em ADN de cadeia dupla, essencial à expressão do transgene.

No sentido de explorar a permissividade das células endoteliais aos rAAV, procedeu-se à sua incubação com diferentes serotipos deste vector, concluindo-se que as células HUVEC não são permissivas à transdução por rAAV dos tipos 1, 2, 6 e 8. Assim, e com o objectivo de determinar se os resultados observados seriam consequência de limitações de internalização celular, e no sentido de potenciar este processo em células HUVEC, procedeu-se à mistura de rAAV com diferentes tipos de lipossomas, nomeadamente lipossomas catiónicos, lipossomas catiónicos com sensibilidade ao pH e lipossomas aniónicos (preparados na presença e ausência de proteínas adjuvantes). Surpreendentemente, não se observou transdução em qualquer das situações e, como tal, estas experiências não permitiram concluir se a ausência de

expressão do transgene, verificada com os rAAV livres em células HUVEC, se deve de facto a limitações de internalização celular.

Contrariamente aos rAAV, os vectores adenovirais (rAd) permitem obter uma expressão do transgene elevada, apesar de transitória, em células endoteliais. Por esse motivo, optou-se por substituir os rAAV pelos rAd, mantendo os imunolipossomas como nanotransportadores.

Uma das limitações dos vectores adenovirais é a sua imunogenicidade. Assim, a administração de doses elevadas destes vectores induz a activação da resposta imunitária inata, como resultado da exposição directa das proteínas da cápside viral a monócitos e macrófagos, ou da exposição de antígenos virais expressos à superfície das células infectadas. Por outro lado, a resposta imunitária adaptativa, nomeadamente mediada por anticorpos, é responsável pela neutralização do vector, antes deste atingir as células alvo. Neste contexto, importa referir que a maioria da população humana já teve contacto com adenovírus, e portanto possui anticorpos contra estes vectores, facto que promove a sua neutralização após administração.

As limitações referidas constituíram um estímulo ao desenvolvimento de um novo método de entrega direccionada de vectores adenovirais para células endoteliais activadas, conferindo-lhes adicionalmente características que permitam a sua administração intravascular.

A estratégia utilizada consistiu em tentar encapsular vectores adenovirais nos nanotransportadores anteriormente desenvolvidos. Espera-se que a formulação resultante permita mascarar os vectores virais, minimizando, por um lado, a resposta imunitária inata desencadeada, e por outro lado, a sua neutralização, normalmente mediada por anticorpos preexistentes contra as proteínas virais da cápside. No desenvolvimento da formulação colocou-se também a hipótese de que a resposta imunitária adaptativa, com o desenvolvimento de anticorpos contra os rAd, seria atenuada pelo facto dos vectores se encontrarem menos expostos aos linfócitos B.

Para além da vantagem referida, a carga negativa dos lipossomas desenvolvidos, por oposição à utilização de lipossomas catiónicos, permite minimizar interacções não específicas com proteínas de carga negativa e células sanguíneas, representando uma vantagem adicional.

No processo de desenvolvimento da formulação, foi possível identificar um método eficiente para remoção dos rAd não associados aos imunolipossomas, tendo-se adicionalmente readaptado o processo de preparação dos imunolipossomas, em função

da viabilidade destes vectores virais. A técnica de preparação utilizada permitiu gerar imunolipossomas contendo rAd, exibindo um tamanho médio de 185 nm.

A análise por microscopia confocal de células incubadas com estes imunolipossomas, permitiu concluir que estes são internalizados, indicando que esta estratégia é promissora para a entrega intracelular de transgenes a células endoteliais activadas.

Apesar dos baixos valores de eficiência de encapsulação observados com os vectores adenovirais, foi possível observar transdução, a qual ocorre de um modo específico, permitindo o estabelecimento de uma curva tipo dose/resposta. A especificidade da transdução na presença de soro de bovino não desactivado é indicativa da estabilidade da formulação em condições mais próximas das fisiológicas.

Os resultados da análise da viabilidade celular demonstraram que a formulação, uma vez associada às células, induz alguma toxicidade. Provavelmente, a referida toxicidade resulta do facto das preparações de vectores de primeira geração utilizados se encontrarem contaminados com vírus com capacidade de replicação e, conseqüentemente, com capacidade para induzir lise celular. No que diz respeito aos mecanismos pelos quais os imunolipossomas interagem com as células endoteliais em cultura, a ausência de internalização celular verificada a 4 °C indica que este processo é dependente de energia, sugerindo o envolvimento da via endocítica. Os estudos de inibição competitiva realizados indicaram claramente que a transdução destas células é um processo dependente da internalização dos imunolipossomas mediada especificamente pela E-selectina expressa à superfície das células activadas.

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que se efectua encapsulação de vectores adenovirais em lipossomas, seguida do acoplamento de um ligando com o objectivo de conferir direccionamento.

De um modo geral, pode concluir-se que a formulação desenvolvida demonstrou ser eficiente no reconhecimento e entrega de adenovírus recombinantes a células endoteliais activadas, com conseqüente expressão do transgene transportado. Estes resultados, a par do facto dos imunolipossomas apresentarem características adequadas para administração sistémica, traduzem o seu elevado potencial para aplicação em terapia génica para patologias com envolvimento de células endoteliais.

Dado que a formulação desenvolvida satisfaz os pré-requisitos referidos, considerou-se estarem reunidas as condições para proceder a uma primeira avaliação da sua eficácia *in vivo*. Adicionalmente, propôs-se avaliar sobre a capacidade dos

imunolipossomas em atenuar a imunogenicidade dos rAd (particularmente o desenvolvimento de anticorpos) através da sua encapsulação.

Apesar das expectativas criadas a partir dos resultados *in vitro*, o carácter preliminar das experiências efectuadas *in vivo* não permitiu concluir com certeza acerca da eficácia e da especificidade da formulação em aplicações *in vivo*. Face a estes resultados, será necessário em trabalhos futuros realizar uma análise sistemática dos vários parâmetros que podem condicionar a eficiência da formulação *in vivo*, à semelhança do que se efectuou nos estudos realizados *in vitro*.

Contudo, os resultados obtidos permitiram concluir que a maioria das proteínas do soro dos animais interage fortemente com as proteínas dos vectores virais livres. A interacção observada é provavelmente resultado de interacções não específicas e constitui um factor limitativo da sua eficiência de transdução, facto que reforça as vantagens da encapsulação dos rAd em lipossomas.

Surpreendentemente, os rAd encapsulados em lipossomas induziram o aparecimento de uma resposta imunitária adaptativa superior à desencadeada pelos rAd livres, sendo esta diferença menos pronunciada quando se utilizaram imunolipossomas. Estes resultados revelam que o efeito imunoadjuvante das formulações supera o efeito de mascarar os vectores virais face aos linfócitos B.

Apesar de preliminares, estes resultados constituem um contributo para a discussão em torno dos mecanismos envolvidos na resposta imunitária desencadeada pelos sistemas lipossómicos, que só recentemente começaram a despertar o interesse da comunidade científica. Considera-se que o trabalho desenvolvido suscita novas questões que constituem o ponto de partida para trabalhos futuros em torno da utilização *in vivo* de nanosistemas direccionados encapsulando vectores virais.

ABSTRACT

The progress in the field of molecular biology resulted in a new concept for the treatment of diseases, known as gene therapy, which can be defined as the introduction of polynucleotides in human cells with a therapeutic purpose. In this context, the cells of the vascular endothelium constitute an important target for gene delivery, since they are involved in a large number of pathologies, such as cancer, inflammatory diseases, and pathologies that occur with ischemia. The delivery of adequate genes to these cells has the potential to interfere with the progression of the diseases, and could be used either as an alternative or as a concomitant approach to the therapeutic protocols currently available, which still present limitations in the treatment of the referred conditions. In this context, it has been demonstrated that the inhibition of the angiogenic process constitutes an important strategy in the control of tumour growth, since the formation of new blood vessels represents a critical requirement for the growth of tumour cells. Furthermore, in the absence of a vascular system, the majority of the tumours are not able to expand, remaining non invasive. On the other hand, in pathologies that occur with ischemia, the induction of angiogenesis based on the vascular growth under the influence of the adequate growth factors has also shown to be a promising strategy.

In another context, silencing the expression of adhesion molecules or inflammatory cytokines, as well as the induction of the expression of anti-inflammatory cytokines, like interleukine-4 (IL-4), might have an important role in anti-inflammatory therapies.

In the above referred clinical applications, one of the main challenges of gene therapy consists in the specific delivery of the therapeutic genes to areas where their expression is required. For this reason, the development of adequate systems (both in terms of safety and efficiency) for the intravenous administration of therapeutic genes can greatly increase the potential of gene therapy applications. One of the main requirements of such systems should be their ability to discriminate between endothelial cells in the physiological state and those directly involved in the disease. These issues constitute the scope of the present dissertation.

Among the vectors available in the field of gene therapy, non-viral vectors, particularly plasmids, are considered to be the safest. Conventional plasmids mediate transient gene expression since they do not replicate in the cells, which limits their

application to situations that require temporary expression of the therapeutic protein, as in the case of the production of cytotoxic proteins in antitumoral therapies.

One of the standard methods used to transfer plasmid DNA to cells includes its complexation with polycations, namely with the polymer polyethylenimine (PEI). This polymer allows condensation of the DNA molecule and facilitates its release from the endosome, steps that are considered to be crucial for the efficacy of the transfection process. These properties are mainly a consequence of the high density of amine groups present in the polymer, which are only partially protonated at the physiological pH. After internalization of the PEI/DNA complexes by the cells and acidification of the endosomes, the protons are captured by the amine groups of PEI, preventing the decrease of pH in that cell organelle. As a consequence, the proton influx is maintained and accompanied by the influx of chloride ions and water, causing an increase of the osmotic pressure and consequently rupture of the endosome, thus allowing the escape of the internalized material. This event is responsible for the buffer effect and constitutes the basis for the designation of “proton sponge”, often attributed to this polymer. The branched structure of certain PEI molecules, containing primary, secondary and tertiary amines enables the buffer capacity through a wide pH range.

The high efficacy of transfection obtained *in vitro* with complexes of PEI and DNA (PEI/DNA) raised high expectations for their application in gene therapy. However, as it has been described for cationic liposomes, the presence of positive charges in the surface of the polyplexes jeopardizes the effect of targeting *in vivo*, mainly when intravenous administration is considered. Therefore, in order to overcome the limitations associated with the cationic systems, namely the non-specific interactions between the carriers and cells and/or serum proteins, PEI/DNA complexes were shielded with neutral or negatively charged liposomes, originating the hereby designated lipopolyplexes (LPPX). Additionally, the polymer poly(ethylenoglycol) (PEG) was incorporated with the aim of increasing the circulation time of the resulting transgene carriers. Moreover, their size was modulated by extrusion in order to contribute, both with the absence of positively charged lipids and presence of the polymer PEG, to a high *in vivo* stability. Aiming at promoting the interaction of the resulting carrier with the target cells, specific ligands were incorporated to confer targeting properties. The referred cell interaction should be characterized by a high affinity and trigger the internalization of the nanocarrier. Once internalized, the nanocarriers should be released from the endosome to the cytosol, thus preventing DNA

degradation in the lysosomes. After being released, the transgenes are expected to move along the cytoplasm complexed with PEI, to prevent their degradation. The entry of the transgene into the nucleus of the cell constitutes a critical parameter in gene therapy, mainly when non-viral vectors are used as gene delivery systems. In this context, the most common strategy to overcome the nuclear membrane consists in the incorporation of nuclear localization signals (NLS). However, the use of polymers such as PEI might also play an important role at this stage by condensing the DNA molecules, and thus facilitating their entry to the nucleus. After nuclear internalization, the extent and duration of the transgene expression will depend on the plasmid construction and its dissociation from the complex.

Summarizing, the first stage of this work consisted in the development of a formulation and its optimization, a process that can be divided into three steps. In a first step (a) the DNA was complexed with PEI, and in a second step (b) the resulting polyplexes were associated with neutral or negatively charged liposomes. Finally, in the last step (c) the PEG molecules were coupled to the lipopolyplexes followed by coupling the ligand transferrin to the distal end of the PEG molecules. In the first step of the development of the formulation (a), the polyplexes were characterized namely in terms of size, buffer capacity and transfection activity. In parallel (b), several methods for quantification of DNA were analysed which allowed the determination of the most favourable experimental conditions in terms of recovery of DNA associated to the liposomes. In a third step (c), corresponding to the incorporation of the ligand transferrin, the influence of different concentrations of PEI molecules and different amounts and types of the reactive PEG in the coupling efficiency of the ligand, was also tested.

The end product resulting from the first stage of the work has shown a favourable profile in terms of cell interaction, with the carrier exhibiting the capacity to recognise cells bearing transferrin receptors, although transfection activity was below the expected value.

Following the first stage of optimization and after demonstrating the concept of interaction with target cells, the second stage of the work consisted in exploring the potential application of the developed formulation in pathologies involving activated endothelial cells. The developed LPPX were associated to a ligand consisting of an antibody against human E-selectin, adequate to the new cell target. The cell model used was based on the activation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) with

inflammatory mediators, such as TNF- α (tumor necrosis factor- α), resulting in the overexpression of several glycoproteins, namely E-selectin, mimicking the process of activation of endothelial cells that occurs in the previously referred pathologies.

In this context, some parameters, such as lipid concentration and nanocarrier size, were analysed in order to determine their role in the extent of association of the resulting nanocarrier to the target cells. Further experiments demonstrated that although the extent of association was high and selective, the transgene expression was not detectable. The main reasons for those results can be the lack of efficiency of the formulation to deliver DNA to the target cells and/or a consequence of post-internalization limitations of HUVEC cells in processing plasmid DNA. In this context, the failed attempt to observe transfection with control formulations, namely cationic liposomes, did not allow the identification of the exact limiting steps.

In an attempt to overcome the overall transfection inefficiency, in a third stage of the work the replacement of the plasmid vectors by viral vectors, known for their efficiency in transducing a high variety of cells, was considered. The hypothesis was that encapsulation of adeno-associated viral vectors (rAAV) in liposomes could induce high levels of expression of the transgene as a consequence of the transduction efficiency of viral vectors and specifically in the target cells, as a result of the delivery mediated by targeted liposomes.

The adeno-associated viral vectors have a single stranded DNA, and enter the cells after interaction with heparan molecules present on the cell surface. After overcoming the cytoplasmic and nuclear membrane barriers, the single-stranded DNA must be converted into double-stranded DNA to allow transgene expression. These vectors are responsible for the long term expression of the carried transgene, namely in muscle fibers after *in vivo* administration.

In this stage, following the identification of the most efficient method to remove the free rAAV (not associated to the liposomes), and after determination of the encapsulation efficiency, the formulation was equipped with a targeting system, both for cells presenting transferrin receptors and activated endothelial cells, using the appropriated ligands. Both approaches resulted in carriers that demonstrated to be efficient in the identification of the respective target cells, although the transduction was not detectable. This finding may result from an insufficient delivery of rAAV to the cells (as a result of the low titer of AAV production), and/or from a low extent of target cell association (particularly in transferrin-conjugated liposomes). Independently of

these factors, the possibility that the high efficiency of transduction that usually characterizes these vectors would be enough to induce expression of the transgene after association with liposomes was not observed. The hypothesis that rAAV might have been processed through intracellular pathways that inhibited their activity should not be excluded. Furthermore, HUVEC cells in particular may not be able to convert the single stranded DNA into double stranded DNA, which is essential for expression of the transgene to occur.

In order to gain insights into the limitations of transduction of HUVEC by rAAV, the endothelial cells were incubated with different rAAV serotypes. The results allowed concluding that HUVEC cells are not permissive to transduction mediated by rAAV types 1, 2, 6 and 8. Aiming at further understanding whether these results could be a consequence of limitations in rAAV internalization and in order to overcome this drawback, the rAAV were simply mixed with different types of liposomes, namely cationic liposomes, cationic liposomes exhibiting pH-sensitivity and anionic liposomes (prepared in the presence or absence of helper proteins). Surprisingly, HUVEC cells were never efficiently transduced in any of the tested conditions. Based on these results it was not possible to conclude whether the absence of gene expression mediated by free rAAV in HUVEC cells is indeed a consequence of limitations in the cellular internalization step, or whether in addition, post-internalization processing might contribute to the lack of transgene expression.

As opposed to the rAAV, the adenoviral vectors are characterized by high expression, although transient, in endothelial cells. For this reason, in a fourth stage, the rAAV were replaced by rAd, while maintaining the targeted liposomes as carriers.

A limitation of the adenoviral vectors relies on their immunogenicity. When high doses of these vectors are administered to humans, they induce activation of the innate immune response, as a result of the direct exposure of the viral capsid proteins to monocytes and macrophages or by the exhibition of viral antigens expressed on the surface of the infected cells. On the other hand the adaptive immune response, particularly mediated by the antibodies, is responsible for the neutralization of the vector before it reaches the target cells. In this context it is important to refer that the majority of the human population had a previous contact with adenoviruses and therefore presents antibodies against them.

The referred limitations prompted the development of targeted delivery of adenoviral vectors, in an attempt to confer them adequate features for intravenous administration.

The strategy used in this work consisted in the encapsulation of the viral vectors in the above referred targeted nanocarriers. The aim was that such a formulation would allow masking the viral vectors, thus decreasing the innate immune response triggered by them, and their neutralization, as a consequence of potential pre-existing antibodies against the viral proteins. During the development of the formulation it was also considered that the adaptive immune response could be attenuated as a consequence of viral vectors shielding by the liposome and therefore a decreased exposure to B lymphocytes.

In addition to the referred advantages, the use of negatively charged liposomes as opposed to cationic liposomes, allows to minimize non-specific interactions with negatively charged serum proteins and blood cells, thus constituting an additional advantage.

During this stage of the work it was possible to identify an efficient method to remove the free rAd (non-associated to the liposomes). Furthermore the process of preparation of the carriers was modified to meet the experimental conditions compatible with viral vector viability. Incubation of the resulting targeted carriers with the cells resulted in their internalization, indicating that this strategy is promising for the intracellular delivery of transgenes to activated endothelial cells. Additionally, it was observed that gene delivery and transduction occurred in a specific manner even though the encapsulation efficiency values were very low. The specificity of transduction, observed in the presence of non-inactivated bovine serum is an indication of the stability of the formulation under conditions closer to the physiologic.

Further results concerning cell toxicity demonstrated that the formulation, once internalized, induces a decrease in cell viability. The referred effect is most likely a result of the rAd, since the preparations of first generation viruses are frequently contaminated with replicating competent viruses which have the capacity to induce cell lysis. Concerning the mechanisms involved in the interaction of targeted carriers with cultured endothelial cells, the absence of cell internalization observed at 4 °C indicates that this process is dependent on energy, suggesting the involvement of the endocytic pathway. The studies of competitive inhibition clearly indicate that the internalization of

the developed carriers was specifically mediated by the E-selectin molecules expressed on the surface of the activated endothelial cells.

To our knowledge, this is the first study involving the encapsulation of the adenoviral vectors into liposomes and the simultaneous integration of an active targeting system.

Overall, it can be concluded that the developed formulation is efficient in identifying and delivering rAd to activated endothelial cells, with the consequent expression of the carried transgene. At the same time, the carrier presents adequate characteristics for systemic administration, thus revealing their potential for gene therapy protocols involving endothelial cells.

In view of the promising *in vitro* data there were great expectations regarding *in vivo* studies. However, the preliminary results did not allow concluding about the *in vivo* efficacy and specificity of the formulation. Future work should address the systematic analysis of several parameters that can determine the efficiency of the formulation *in vivo*, similarly to the performed *in vitro* studies.

Additional results allowed concluding that serum proteins of the animals strongly interact with the viral vector proteins. The observed interaction is probably the result of non-specific interactions thus leading to a decrease in the transduction efficiency, which reinforces the advantages of encapsulating the rAd into liposomes.

Concerning the production of antibodies, liposome encapsulating rAd induced an adaptive immune response higher than the one triggered by free rAd, this difference being less pronounced when targeted liposomes were used. These results reveal that the immunoadjuvant effect of the liposomes is stronger than their masking effect towards B lymphocytes.

Although preliminary, these results constitute a contribution to the discussion around the mechanisms involved in the immune response promoted by the liposome systems which only recently triggered the interest of the scientific community. The developed work raises new questions that constitute the starting point for future work related to the *in vivo* use of targeted nanocarriers encapsulating viral vectors.

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Terapia génica e doenças vasculares

Na primeira secção deste capítulo pretende-se salientar a importância das células endoteliais activadas enquanto elemento comum a uma variedade de situações patológicas, e como tal realçar a sua potencialidade como alvo em estratégias de terapia génica. Numa segunda secção, procede-se à apresentação de alguns dos vectores actualmente disponíveis em terapia génica, suas vantagens e limitações, referindo-se numa secção subsequente algumas das potenciais abordagens terapêuticas para as patologias referidas. Face à limitação inerente às abordagens terapêuticas apresentadas, concretamente a administração local, tecem-se *à posteriori* considerações sobre os desafios relacionados com a utilização de uma via de administração alternativa, a via intravenosa. Finalmente, são referidos alguns dos aspectos que foram ponderados durante a concepção dos transportadores de material genético apresentados nesta dissertação, de modo a ultrapassar os desafios referidos.

O conceito de terapia génica inerente a este estudo pode ser definido como qualquer estratégia de tratamento que assente na introdução de polinucleótidos em células humanas, com objectivos terapêuticos. Neste âmbito, as células do endotélio vascular, correspondendo à camada de células mais interna dos vasos sanguíneos (Figura 1), constituem um alvo muito importante em termos terapêuticos, uma vez que se encontram envolvidas em inúmeras patologias, tais como cancro^{1,2}, doenças inflamatórias^{3,4} e em patologias que decorrem com isquémia^{5,6}.

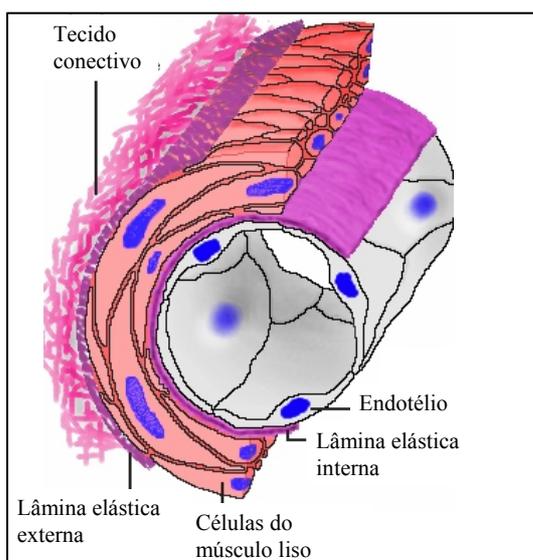


Figura 1- Representação esquemática de um vaso sanguíneo

Adaptado de imagem do site da Internet <http://www.siumed.edu/~dking2/crr/cvguide.htm>

A entrega de genes adequados a estas células poderá modelar a progressão das referidas patologias, surgindo como uma terapia alternativa ou concomitante face às estratégias de tratamento actualmente disponíveis, as quais, apesar dos avanços recentes, continuam a apresentar limitações.

Actualmente, são várias as ferramentas disponíveis para aplicação em terapia génica. Na próxima secção referem-se alguns dos principais vectores que poderão ser utilizados nesta área, assim como as suas principais vantagens e limitações.

1.1.1. Vectores disponíveis em terapia génica

São vários os tipos de vectores correntemente utilizados em terapia génica. Na Figura 2 ilustram-se os principais grupos de vectores utilizados em ensaios clínicos, podendo estes, de um modo geral, classificar-se em vectores virais, vectores não virais e métodos físicos, incluindo-se neste último o método da electroporação. No âmbito desta dissertação, os métodos mais relevantes encontram-se inseridos nos grupos dos vectores virais e não virais, e como tal apresentam-se de seguida algumas das características mais relevantes destas duas classes.

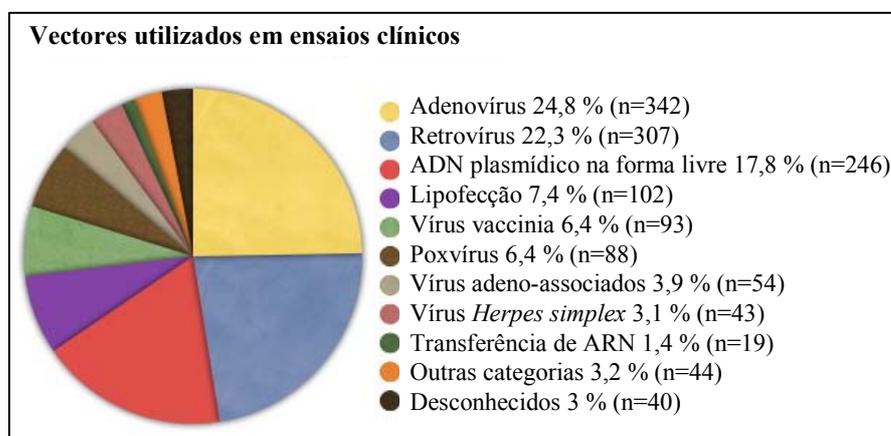


Figura 2- Vectores utilizados em ensaios clínicos na área da terapia génica até Março de 2008

Adaptado de imagem original do site da Internet <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

1.1.1.1. Vectores não virais

i. Plasmídeos

Os vectores de ADN incluem plasmídeos convencionais, vectores com capacidade de integração no genoma, vectores episomais replicativos dependentes da expressão de proteínas virais e vectores baseados em elementos genéticos do genoma humano⁷.

Os plasmídeos convencionais não apresentam capacidade de replicar em células de mamífero, e como tal a sua expressão é transitória⁷, excepto quando são integrados no genoma, o que sucede com uma frequência muito baixa (1 a 30 cópias de plasmídeo por 150 000 células, ou 980 cópias de plasmídeo no caso de electroporação)⁸. Assim, a sua aplicação apresenta-se maioritariamente limitada a situações que requerem expressão transitória da proteína terapêutica, como por exemplo, a expressão de proteínas citotóxicas em terapia oncológica.

Os avanços mais recentes em vectores de natureza não viral tiveram como objectivo mimetizar algumas das propriedades exibidas pelos vírus, como por exemplo a manutenção no núcleo da célula hospedeira e a replicação, quer através da inserção específica no genoma, quer através da manutenção extra-cromossómica enquanto episomas.

No que respeita à inserção específica, são várias as estratégias que apresentam potencialidade para promover a integração de plasmídeos no genoma das células que se pretende afectar. Neste contexto, podemos referir a recombinação homóloga, a qual, apesar da elevada especificidade, ocorre com uma frequência muito baixa *in vivo* (até 0,1 % no músculo *tibialis anterior*)⁹, comprometendo a sua utilização com objectivos terapêuticos.

Alternativamente, podem utilizar-se determinadas enzimas de bacteriófagos, designadas recombinases (*site-specific recombinase* ou SSR), que normalmente integram o material genético viral em locais específicos do genoma dos organismos procariontes que infectam (locais de recombinação). A principal limitação desta abordagem consiste na baixa eficiência das referidas enzimas, em identificar sequências específicas no genoma de eucariotas, dificultando a sua utilização em células humanas.^{10,11}

Outros vírus, nomeadamente os vírus adeno-associados (AAV), apresentam a capacidade de integrar o seu ADN no genoma de células humanas, recorrendo para tal a

proteínas de replicação designadas proteínas REP¹². Contudo, a utilização destas sequências virais em plasmídeos encontra-se limitada pela citotoxicidade que estas proteínas parecem apresentar em células humanas, exibindo ainda a capacidade de remover o transgene já inserido no genoma, o que, no seu conjunto, prejudica a sua utilização em estratégias de terapia génica¹¹.

No que respeita à manutenção nuclear e replicação de plasmídeos enquanto unidades genéticas independentes do genoma hospedeiro, também se podem considerar várias abordagens. Neste contexto, determinados vírus de ADN, tais como o EBV (vírus Epstein-Barr) e o SV40 (vírus de Símios 40), apresentam a capacidade de replicar o seu genoma em células de mamífero, enquanto unidades genéticas independentes do genoma das células hospedeiras, unidades estas designadas por epissomas^{13,14}. No sentido de conferir aos plasmídeos convencionais características semelhantes às dos referidos vírus, procedeu-se inicialmente à exploração destes elementos virais¹⁴. Os plasmídeos preparados utilizando as sequências virais adequadas (ORI viral), e codificando as proteínas virais necessárias à replicação em *trans*, apresentam elevados níveis de transfecção¹⁵⁻¹⁷ com a vantagem adicional de replicarem apenas uma vez por cada ciclo de divisão celular¹⁸. Uma desvantagem importante destes sistemas é que as proteínas virais utilizadas podem provocar retinoblastoma e desregulação da via celular que inclui a proteína p53⁷.

Uma aproximação alternativa e mais segura envolve a geração de sistemas que exploram elementos genéticos humanos, os quais desempenham funções na manutenção da arquitectura dos cromossomas nas células. Nestes elementos genéticos incluem-se as regiões de ligação da matriz (*scaffold/matrix attachment regions* ou S/MARS), isoladores (*insulators*) e regiões de controlo local (*locus control regions* ou LCRs). A construção de um vector incluindo as regiões S/MAR do *cluster* do interferão- β humano, designado pEPI, apresenta a característica de ser mantido de um modo estável em várias linhas celulares humanas e de roedores, sendo propagado enquanto epissoma por várias centenas de divisões, nomeadamente em células CHO e HeLa¹⁹⁻²¹.

Apesar do ADN livre não provocar uma resposta imunitária específica, contém sequências de dinucleótidos compostas por citosina e guanina, sequências que, se de origem bacteriana, induzem uma forte resposta imunitária acompanhada da produção de citocinas inflamatórias. Este aspecto tem sido explorado na aplicação de vacinas de ADN, mas pode constituir uma desvantagem em terapias de doenças crónicas.

ii. Transportadores de material genético

O interesse subjacente à utilização de plasmídeos resulta das preocupações de segurança normalmente associadas à utilização de vectores virais. Contudo, e apesar das potencialidades associadas à terapia génica, os polinucleótidos apresentam propriedades químicas e físicas que não são as mais adequadas à entrega celular, de tal modo que a transferência eficiente destes implicou o desenvolvimento de sistemas de transporte de genes.

Neste contexto, os vectores não virais apresentam uma elevada versatilidade de concepção e construção, apresentando adicionalmente uma capacidade elevada para incorporar ADN. Apesar destas vantagens, a estimulação da resposta imunitária e inflamatória deve ser ponderada, sendo que este aspecto depende das características dos diversos transportadores utilizados, constituindo um aspecto que requer maior atenção quando se consideram protocolos terapêuticos que impliquem administrações repetidas.

Um dos métodos padrão utilizado para transferência do ADN plasmídico inclui a complexação com catiões, a qual apresenta, entre outras vantagens, o facto de conduzir à condensação e à protecção do ADN durante o transporte, consequência do impedimento do acesso de pequenas moléculas tal como ADNases, conforme demonstrado com testes de acessibilidade do brometo de etídio²². Apesar da capacidade dos referidos complexos para mediar transfecção em células em cultura ter sido largamente reconhecida, a sua eficiência *in vitro* não se correlaciona com a sua eficiência após administração *in vivo*^{23,24}. Adicionalmente, as aplicações *in vivo* praticáveis para estes sistemas catiónicos cingem-se principalmente a administrações locais, tais como a administração intramuscular²⁵, intranasal²⁶ e intratumoral^{27,28}, uma vez que permitem a entrega directa às células alvo. Ainda assim, estes complexos interagem com proteínas solúveis e com elementos dos tecidos, tais como proteínas da matriz e células, minimizando a sua eficiência de transfecção *in vivo*.

No entanto, os sistemas catiónicos apresentam a potencialidade de direccionar o transgene transportado para qualquer tipo celular, através da introdução de ligandos que interagem com receptores específicos expressos à superfície das células. A asialoglicoproteína²⁹ e a transferrina³⁰⁻³² foram utilizadas com esse propósito, direccionando complexos de polilisina e ADN a hepatócitos e a células com receptores da transferrina, respectivamente. O factor de crescimento epidérmico (EGF)³³ e anticorpos contra o seu receptor³⁴ foram utilizados para direccionar complexos semelhantes para células apresentando receptores de EGF.

Sistemas idênticos utilizando o polímero polietilenimina foram igualmente testados. Este polímero apresenta uma elevada densidade de aminas, as quais permitem a ligação ao ADN por interacções electrostáticas, analogamente a outros sistemas catiónicos, apresentando adicionalmente a capacidade de promover a lise do endossoma por efeito osmótico, aumentando a eficiência de entrega intracelular do transgene. À semelhança dos complexos de polilisina, também estes podem ser direccionados, por exemplo para hepatócitos³⁵, para células possuidoras de integrinas³⁶ e para células dendríticas³⁷.

Paralelamente à utilização de polímeros, também se tem testado a utilização de lipossomas de carga positiva compostos por lípidos catiónicos monovalentes (por exemplo, DOTMA e DOTAP) e multivalentes (por exemplo DOSPA e DOGS) para complexação do ADN, sendo que os lipoplexos resultantes podem igualmente ser sujeitos a direccionamento, tal como demonstrado pela utilização do ligando folato³⁸, do ligando transferrina³⁹, ou mesmo utilizando anticorpos monoclonais desenvolvidos contra determinadas moléculas⁴⁰.

Apesar dos esforços para promover o direccionamento de sistemas catiónicos, o excesso de carga positiva que os caracteriza pode aumentar a interacção não selectiva com as células, mascarando, deste modo, o efeito de direccionamento do ligando⁴¹. Assim, os sistemas neutros e aniónicos apresentam-se como a alternativa mais promissora no que respeita ao direccionamento específico. Contudo, a sua utilização apresenta limitações importantes quando comparados com lipossomas catiónicos: (i) menor associação do ADN aos lipossomas e (ii) menor extensão de interacção entre os transportadores e as células, ambas consequência da menor interacção electrostática, aspectos que no seu conjunto podem justificar a baixa eficiência de transfecção obtida com este tipo de lipossomas.

1.1.1.2. Vectores virais

Os vírus representam os transportadores naturais, e de um modo geral pode afirmar-se que os vírus recombinantes constituem o modo mais eficiente de entregar os genes às células.

Entre os vários tipos de vectores virais, salientam-se os vectores adenovirais, os vectores adeno-associados e os vectores retrovirais, incluindo-se neste último os vectores lentivirais.

i. Vectores adenovirais

Os adenovírus são caracterizados por interagir com as células através de uma fibra proteica viral, a qual reconhece o receptor de coxsackievírus e de adenovírus (CAR), presente à superfície das células^{42,43}. Após internalização, dependente de peptídeos RGD virais, a acidificação dos endossomas causa alterações conformacionais nas proteínas da cápside viral, resultando na permeabilização da membrana deste organelo⁴⁴. A translocação para o núcleo pode então decorrer, sendo o ADN viral expresso. Os adenovírus recombinantes não induzem a integração estável do transgene no genoma hospedeiro, permanecendo este extra-cromossomal, promovendo uma expressão do transgene elevada, embora transitória, quer em células mitóticas, quer em células que não se dividam⁴⁵.

Apesar dos vectores adenovirais apresentarem uma elevada eficiência na transdução de células endoteliais, conforme demonstrado nesta dissertação, são extensamente eliminados pelas células de Kupffer, os macrófagos predominantes no fígado, o que conduz à sua rápida eliminação. Adicionalmente, a imunogenicidade que os caracteriza também condiciona a sua actividade *in vivo*^{46,47,48,49}. Assim, a administração de doses elevadas destes vectores causa toxicidade como consequência da activação da resposta imunitária inata, a qual envolve a indução de citocinas, tais como a IL-6 e a IL-8, como resultado da exposição directa das proteínas da cápside viral a monócitos e macrófagos, ou pela exposição de antígenos virais expressos à superfície das células infectadas. Por outro lado, a presença de anticorpos antes da administração destes vectores é responsável pela neutralização, impedindo que estes atinjam as células a transduzir^{50,51,52}. Neste contexto, importa referir que a maioria da população humana já teve contacto com adenovírus e portanto possui imunidade humoral contra estes vectores⁵³.

Após o exposto, conclui-se que os vectores adenovirais poderão constituir transportadores apropriados em situações que requeiram expressão transitória do transgene (ex: terapia suicida anti-tumoral, terapia angiogénica). Adicionalmente, pode especular-se que a sua utilização mais generalizada possa ser favorecida pelo desenvolvimento de sistemas de transporte susceptíveis de encapsular as partículas adenovirais, e assim garantir a sua protecção contra anticorpos preexistentes nos indivíduos a tratar, ao mesmo tempo que possibilitam a sua entrega específica a células pré-seleccionadas.

ii. Vectores virais adeno-associados

No que respeita aos vectores adeno-associados, estes apresentam cadeia simples de ADN e entram nas células por intermédio de moléculas de heparano existentes na superfície celular. Após migração no citoplasma e translocação para o núcleo, o ADN de cadeia simples deverá ser transformado em ADN de cadeia dupla⁵⁴. Apesar da eliminação das sequências que codificam as proteínas REP, responsáveis pela integração do genoma viral no locus específico do cromossoma 19, especula-se que os vectores resultantes mantenham alguma capacidade de integrar no genoma humano, apesar de um modo mais aleatório. Deste modo, não é de excluir a possibilidade de activação de oncogenes, aspecto que deverá ser considerado no âmbito da optimização destes vectores.

Uma das características mais marcantes dos vectores adeno-associados, também designados vírus adeno-associados recombinantes, é a sua capacidade de transduzir fibras musculares *in vivo* por períodos muito prolongados⁵⁵, o que juntamente com a capacidade de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro⁵⁵ constitui uma das grandes vantagens atribuídas a estes vectores. Surpreendentemente, num ensaio clínico recente envolvendo o tratamento de indivíduos com hemofilia, a expressão do factor IX a nível dos hepatócitos demonstrou ser transitória e acompanhada de alguma hepatotoxicidade, sendo provável que este efeito seja consequência de uma resposta às proteínas da cápside viral e não ao produto do transgene⁵⁶.

iii. Vectores retrovirais

Os retrovírus entram nas células por intermédio de receptores específicos, e após entrada no núcleo, o ARN viral é transcrito em ADN, o qual é integrado no genoma. Esta integração ocorre através de uma integrase que cataliza a recombinação não homóloga⁵⁷, obtendo-se níveis de expressão do transgene elevados⁵⁸. Contudo, os vectores retrovirais (com excepção dos vectores lentivirais) conseguem entregar os transgenes apenas em células com capacidade de divisão.

Estes vectores têm sido utilizados para transferir genes terapêuticos para células endoteliais, embora a eficiência deste processo seja baixa, especialmente *in vivo*, uma vez que, tal como referido, estes vectores só são eficientes em células em divisão^{59,60}.

Até um passado recente, considerava-se que os retrovírus integravam o seu genoma de um modo aleatório e que, como tal a probabilidade de integrarem em genes funcionais do genoma humano era baixa. Contudo, tornou-se óbvio nos últimos tempos,

que tanto os vírus de leucemia murínica (MLV) como os lentivírus integram preferencialmente em regiões de transcrição activa no genoma⁶¹⁻⁶³. O tratamento de doentes com imunodeficiência combinada severa (SCID-X) utilizando vectores retrovirais, realçou o elevado risco de ocorrência de mutagénese por inserção. Com efeito, de um grupo de onze crianças sujeitas a um protocolo de tratamento com estes vectores, quatro desenvolveram leucemia envolvendo células T resultando subsequentemente na morte de uma das crianças⁶⁴⁻⁶⁶. Estes acontecimentos estão na base de investigações recentes no sentido de aprofundar o conhecimento sobre o processo de integração utilizado por estes vectores, de modo a proceder ao seu aperfeiçoamento⁶⁷.

Na tabela 1 encontram-se sistematizadas as principais vantagens e desvantagens dos vectores referidos.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens de vectores utilizados em terapia génica

Tabela adaptada do artigo "Andrew Mountain; Gene therapy: the first decade; vol 18; March 2000"

Vector	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiência de transdução <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> - Transdução de células proliferativas e não proliferativas - Elevada experiência clínica - Demonstração de redireccionamento 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitações na repetição de dose devido à resposta imunitária - Limite de inserção de 5,7 kb - Baixa duração de expressão
Retrovírus	<ul style="list-style-type: none"> - Expressão prolongada - Elevada transdução <i>ex vivo</i> - Elevada experiência clínica <i>ex vivo</i> - Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transdução <i>in vivo</i> - Transduz apenas células proliferativas - Limite de inserção de 8 kb - Problemas de segurança relacionada com mutagénese por inserção - Produção, armazenamento e controlo de qualidade complexos
Lentivírus	<ul style="list-style-type: none"> - Transdução de células proliferativas e não proliferativas - Transdução de células hematopoiéticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Problemas de segurança relacionados com a sua origem (vírus da imunodeficiência) - Produção, armazenamento e controlo de qualidade complexos - Limite de inserção de 8kb - Sem experiência clínica
Vírus adeno-associados	<ul style="list-style-type: none"> - Transdução de uma vasta gama de células <i>in vivo</i> - Expressão prolongada <i>in vivo</i> - Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Limite de inserção de 4,5 kb - Produção e controlo de qualidade complexos - Baixa experiência clínica - Problemas de segurança relacionada com mutagénese por inserção - Limitações na repetição de dose devido à resposta imunitária
ADN livre	<ul style="list-style-type: none"> - Produção, armazenamento e controlo de qualidade simples e de baixo custo - Baixa imunogenicidade - Bom perfil de segurança 	<ul style="list-style-type: none"> - Curta duração da expressão - Baixa eficiência de transfecção <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>
Lipossomas ou polímeros catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> - Produção, armazenamento e controlo de qualidade simples e de baixo custo - Resposta imune aceitável - Bom perfil de segurança - Demonstração de redireccionamento 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transfecção <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> - Curta duração de expressão - Baixa experiência clínica - Dificuldades de transfecção após redireccionamento

1.1.2. Novas abordagens terapêuticas de patologias envolvendo o endotélio vascular

Tal como referido no início deste capítulo, as células endoteliais constituem um alvo privilegiado para aplicação da terapia génica, visando não só a inibição dos processos angiogénicos (cancro e inflamação), mas também a inibição da expressão de factores pertencentes às vias moleculares inflamatórias, como factores de transcrição, moléculas de adesão e citocinas (inflamação). Num outro contexto, a promoção da expressão de factores angiogénicos, tendo por objectivo a neovascularização (doença coronária ou doença vascular periférica), também constitui uma abordagem terapêutica importante. O número de ensaios clínicos a decorrer em terapia génica envolvendo doenças cancerígenas e vasculares é um reflexo da importância referida (Figura 3).

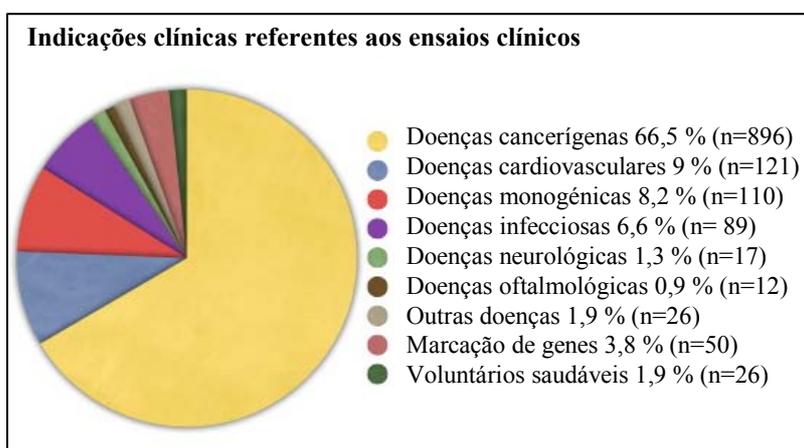


Figura 3- Indicações clínicas referentes a ensaios clínicos na área da terapia génica até Março de 2008

Adaptado de imagem original do site da Internet <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

Tendo por base o conhecimento dos factores que controlam a expressão das diferentes proteínas envolvidas na neovascularização e em processos inflamatórios, são vários os cenários que se colocam em termos de aplicações terapêuticas, sendo que na sua maioria estes apresentam o potencial de serem extrapolados para aplicação em terapia génica.

1.1.2.1. Inibição da angiogénese tumoral

A ocorrência da angiogénese é um requisito crítico para o crescimento tumoral, sendo que na ausência de um sistema vascular, a maioria dos tumores são incapazes de se expandir, permanecendo não invasivos⁶⁸ e sem metastizar^{69,70}. Neste contexto, a

limitação deste fenómeno através da restrição da invasão celular, da mobilidade e da adesão das células endoteliais pode ser conseguida por inibição da actividade de metaloproteinases (MMP) (TIMP-1,2,3 e 4)⁷¹ ou por inibição de moléculas de adesão celular, tal como a integrina $\alpha v\beta 3$ ⁷². Igualmente importantes são os vários inibidores naturais da angiogénese. Entre eles, destaca-se o TSP-1⁷³, a endostatina⁷⁴ e a angiostatina⁷⁵, podendo especular-se que a sua inclusão em vectores apropriados iniba o crescimento tumoral.

Adicionalmente, o VEGF (factor de crescimento do endotélio vascular), um dos mediadores mais importantes na angiogénese tumoral, encontra-se associado a um prognóstico reservado em pacientes com cancro colorectal⁷⁶ e outros tipos de tumores sólidos. Observou-se que a utilização de anticorpos desenvolvidos contra o receptor de VEGF permitiu diminuir a densidade de vasos sanguíneos e reduzir o crescimento de vários tumores em modelos animais⁷⁷⁻⁷⁹.

1.1.2.2. Indução da angiogénese

A aplicação da terapia génica na promoção da angiogénese baseia-se na premissa de que o crescimento inerente ao tecido vascular pode ser utilizado para promover o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos funcionais, sob influência de factores de crescimento apropriados.

São vários os factores que estão envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos e respectiva maturação. Como tal, é provável que nos tratamentos futuros se utilizem combinações destes factores para obter vasos sanguíneos maduros e mais estáveis. Neste sentido, foi já observado que a expressão simultânea de VEGF e de angiopoetina induz a formação de vasos mais estáveis e menos permeáveis do que os formados após utilização de VEGF isoladamente⁸⁰.

No que respeita à transferência de genes para indução da angiogénese, são diversos os vectores e protocolos que têm sido testados. Assim, a transferência de genes mediada por adenovírus em artérias periféricas dos membros inferiores, utilizando um cateter especial, permitiu obter uma expressão do transgene até 5 % das células que compõem o tecido arterial⁸¹. As células transduzidas correspondem a células do músculo liso, células da camada adventícia e células endoteliais.

A administração do gene que codifica VEGF-121, directamente no miocárdio de 21 pacientes, utilizando vectores adenovirais, resultou na melhoria significativa na área injectada, conforme observado por angiografia, sendo que a gravidade da angina

também foi reduzida⁸². De igual modo, foi possível observar um efeito terapêutico após injeção intramuscular do gene codificando VEGF em membros isquémicos^{83,84}.

Na sua maioria, os ensaios clínicos a decorrer encontram-se centrados na angiogénese terapêutica, tratamento da restenose e citoprotecção arterial. Com base na informação disponível, a aplicação da terapia génica ao sistema cardiovascular mediada por VEGF parece ser segura e bem tolerada, apesar do edema nos membros inferiores e da hipotensão reportados em alguns pacientes⁸³. Por outro lado, o VEGF poderá também aumentar a permeabilidade da placa de ateroma, o que levanta questões sobre o aumento da sua instabilidade promovida pelo referido factor. Outros problemas incluem a possibilidade da formação de novos vasos sanguíneos em pacientes com retinopatia diabética, a qual está associada à presença de VEGF no humor vítreo⁸⁵. O efeito mitogénico em pacientes com neoplasmas clinicamente não identificados é outra potencial desvantagem. É necessário ainda prestar atenção a outros possíveis efeitos secundários, como por exemplo a hiperplasia da camada íntima dos vasos sanguíneos, consequência da utilização de determinados factores de crescimento, como o FGF (factor de crescimento de fibroblastos)⁸⁶. Adicionalmente, há que considerar outros efeitos, como os decorrentes do vector utilizado, e não da proteína terapêutica. A título de exemplo, a administração de vectores adenovirais pode induzir febre⁸⁷ e aumento transitório de enzimas hepáticas⁸⁸.

1.1.2.3. Terapia anti-inflamatória

Na terapia anti-inflamatória podem ser consideradas duas abordagens distintas: (i) a inibição de factores angiogénicos e (ii) a modulação de factores envolvidos nas vias de sinalização associadas aos processos inflamatórios.

A fonte de factores pró-angiogénicos em tecidos inflamados ainda é especulativa, mas encontra-se descrito que o VEGF pode ser segregado por plaquetas activadas e neutrófilos, ou ser sintetizado por queratinócitos, células endoteliais ou fibroblastos, como resposta a uma hipoxia local⁸⁹. Numa fase posterior do processo inflamatório, os macrófagos deverão constituir a principal fonte de VEGF, assim como de outros factores pró-angiogénicos⁹⁰. Existem apenas alguns estudos indicativos da eficácia de estratégias anti-angiogénicas na terapia anti-inflamatória. Neste contexto, Storgard e colaboradores observaram uma diminuição da angiogénese e de parâmetros relacionados com a artrite em modelo animal da doença, após tratamento com um antagonista $\alpha v\beta 3$, enquanto Peacock e colaboradores observaram diminuição da

gravidade da artrite após utilização de um composto inibidor da angiogénese^{91,92}. No seu conjunto, todas as estratégias de inibição do processo angiogénico apresentadas na secção 1.1.2.1 (Inibição da angiogénese tumoral) podem ser extrapoladas para aplicação neste campo.

Para além da inibição de factores angiogénicos, a inibição do processo inflamatório poderá ser conseguida de um modo mais directo por modulação de factores envolvidos nas vias de sinalização associadas aos processos inflamatórios. Exemplo desta abordagem consiste na inibição do factor de transcrição NF-kB, o qual, na sua forma activa, desempenha um papel central na modulação da expressão de citocinas e moléculas de adesão, as quais se encontram directamente envolvidas nos processos inflamatórios. A inibição desta via especificamente em células endoteliais apresenta uma grande potencialidade terapêutica³. Adicionalmente, o processo inflamatório poderá ser bloqueado *à posteriori* por inibição de genes codificando moléculas de adesão, tal como demonstrado por Bennet e colaboradores⁹³. Uma outra alternativa consiste em interferir ao nível da expressão de citocinas inflamatórias. Apesar desta intervenção não ser tão focada como no caso da abordagem das moléculas de adesão (uma vez que as citocinas desempenham funções muito mais abrangentes), o bloqueio de certas citocinas, tal como demonstrado por Williams e colaboradores⁹⁴, pode ser útil no processo da doença inflamatória. Outra alternativa consiste na estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4), a qual demonstrou ser eficiente relativamente ao tratamento da artrite reumatóide⁹⁵.

O elevado potencial das abordagens terapêuticas referidas encontra-se parcialmente limitado pelas dificuldades de acesso aos locais apropriados do endotélio vascular. Deste modo, justifica-se que as estratégias referidas se baseiem essencialmente na administração local dos transgenes. A solução óbvia para maximizar a aplicação da terapia génica nas situações anteriormente referidas passa pelo recurso à via de administração intravenosa. No entanto, esta via obriga a um desenvolvimento sistemático dos nanotransportadores, não só como forma de ultrapassar as barreiras biológicas que se colocam perante a utilização desta via, mas também como forma de garantir a eficácia e especificidade de acção. Entre outras características, os nanotransportadores a desenvolver deverão apresentar a capacidade de discriminar entre células endoteliais no estado fisiológico e as mesmas células no estado patológico.

1.1.3. Concepção de nanotransportadores de material genético direccionados para células endoteliais vasculares: factores condicionantes da administração intravenosa

De modo a que a formulação a desenvolver apresente características adequadas para a entrega de genes terapêuticos por administração intravenosa, há que considerar não só as barreiras relacionadas com a via de administração, mas também as barreiras intracelulares, ambas condicionantes da eficiência dos transportadores, limitando em última instância a expressão local da proteína terapêutica. De seguida, são apresentadas algumas considerações sobre os desafios relacionados com a utilização desta via de administração.

1.1.3.1. Interações não específicas com proteínas

A interacção dos vectores não virais com proteínas existentes no soro pode condicionar a sua eficiência. Esta interacção é particularmente relevante no caso de sistemas catiónicos, como os lipoplexos, situação em que a baixa transfecção *in vivo* é, em parte, devida à interacção electrostática estabelecida entre estes complexos e os componentes sanguíneos^{96,97}. Neste âmbito, foi igualmente observado que alguns componentes do soro podem diminuir a entrega de ácidos nucleicos às células alvo, promover a dissociação dos complexos e induzir aumento do seu tamanho⁹⁸.

A interacção com proteínas do soro também parece desempenhar um papel fundamental na inibição da transdução mediada pelos vectores adenovirais, tal como demonstrado no Capítulo 6 desta dissertação.

1.1.3.2. Interações não específicas com células

A interacção dos transportadores com outras células que não as células alvo, pode induzir toxicidade por expressão da proteína em locais inapropriados, assim como levar à diminuição da sua concentração nos locais pretendidos. Concretamente, os complexos catiónicos apresentam a propriedade de interagir de um modo não específico com células do sangue, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos e eritrócitos, o que leva frequentemente não só à desestabilização e eliminação dos complexos, antes de atingirem os tecidos alvo, mas também a reacções inflamatórias potentes, e elevados níveis séricos de enzimas hepáticas⁹⁹. A interacção de lipoplexos com eritrócitos, pode resultar na aglutinação massiva destas células¹⁰⁰, que ocorre independentemente do tipo

de lípido catiónico ou de lípido adjuvante¹⁰¹. Ainda que os aglomerados formados promovam a localização de lipoplexos nos pulmões¹⁰¹, a inserção de DSPE-PEG nos lipoplexos reduz parcialmente estes efeitos.

Este tipo de interação celular, dependente da carga positiva dos lipoplexos, está relacionado com a presença de proteoglicanos na superfície das células. A ligação das partículas catiónicas a estes compostos, constituídos por uma proteína covalentemente ligada a um ou mais glicosaminoglicanos (GAG), é necessária para que ocorra a sua internalização¹⁰². Estudos adicionais demonstram contudo que em certas situações, os GAGs também podem desempenhar um efeito inibitório na entrega de genes, principalmente por promoverem a desestabilização de complexos à superfície das células, levando à libertação extracelular dos plasmídeos¹⁰³.

No que respeita aos vectores virais, sabe-se que os vírus adeno-associados, à semelhança dos lipoplexos, também interagem com glicosaminoglicanos (heparano) para que ocorra a sua internalização nas células que transduzem. Por outro lado, os adenovírus apresentam um tropismo especial para as vias respiratórias, sendo que a sua interação com células, após administração intravenosa, está dependente da expressão de receptores naturais do vírus, como o receptor CAR e as integrinas α_v , à superfície destas⁴³. Apesar de específicas relativamente aos receptores referidos, estas interações celulares limitam a entrega de genes a outras células após administração intravenosa dos referidos vectores.

1.1.3.3. Biodistribuição de lipossomas

A biodistribuição dos transportadores de material genético pode ser condicionada por vários factores, nomeadamente pela sua carga e tamanho. Relativamente à carga, os lipoplexos apresentando um potencial zeta positivo exibem uma acumulação imediata nos pulmões, a primeira rede de capilares que encontram após administração intravenosa, provavelmente consequência da sua agregação. Por outro lado, complexos idênticos preparados de modo a apresentar um potencial zeta negativo não manifestam tendência para acumular nos pulmões, mas sim no fígado, sendo o mesmo observado para lipossomas com carga negativa e para ADN plasmídico¹.

No que respeita ao tamanho, demonstrou-se que lipossomas contendo PEG na sua composição, e apresentando um tamanho superior a 300 nm, são captados pelo baço em elevada extensão¹⁰⁴, enquanto lipossomas mais pequenos (tamanho inferior a 70 nm)

são principalmente retidos no fígado, provavelmente consequência da sua capacidade em atravessar as fenestrações do endotélio hepático^{104,105}.

A principal função das moléculas de PEG, usualmente incorporadas numa proporção entre 2 e 10 %, consiste na prevenção da eliminação dos lipossomas pelo sistema fagocítico¹⁰⁶. Deste modo, gera-se uma área hidratada em redor dos transportadores, que permite prevenir parcialmente a adsorção de proteínas plasmáticas, incluindo opsoninas¹⁰⁷.

Adicionalmente às características referidas, os transportadores podem ser alvo de fenómenos de direccionamento passivo, apenas possível devido à existência de fenestrações endoteliais que permitem, em determinadas situações, a acumulação dos transportadores. Este fenómeno pode ocorrer, por exemplo, em tumores em fase de crescimento, uma vez que o endotélio vascular resultante da angiogénese tumoral é caracterizado pela existência de grandes espaços entre células endoteliais adjacentes, cujo tamanho pode variar entre 600 e 800 nm. Efeitos semelhantes são observados em locais de inflamação. Deste modo, a utilização de lipossomas de tamanho adequado e elevado tempo de circulação permite o extravasamento destes através dos vasos sanguíneos permeáveis, e a sua consequente acumulação nestes locais¹⁰⁸.

1.1.3.4. Interação com células alvo

No caso de transportadores administrados por via intravenosa, a formulação deve permanecer estável até interagir com as células alvo. Assim, e uma vez ultrapassadas as barreiras biológicas anteriormente referidas, a interação específica com as células alvo vai depender das estratégias utilizadas para que este reconhecimento se efectue.

Nesta etapa, é necessário considerar que existem três aspectos que podem condicionar a ligação às células: (i) o número de receptores específicos ou moléculas expressas à superfície das células alvo, (ii) a afinidade da ligação entre os ligandos existentes nos transportadores e os receptores das células e (iii) a extensão do acoplamento do ligando à superfície dos transportadores. Neste contexto, existe um número específico de ligandos que deve estar disponível à superfície dos nanotransportadores. Teoricamente, quanto maior o número de moléculas de ligando, maior a extensão da ligação às células alvo. Contudo, a partir de uma determinada densidade de ligando, o excesso de interação com os respectivos receptores celulares induz a sua subregulação, por selecção dos lipossomas contendo os receptores para degradação, decrescendo assim o número de receptores disponíveis à superfície das

células¹⁰⁹. Este fenómeno encontra-se descrito, por exemplo, para o factor de crescimento epidérmico¹¹⁰.

Concretamente, no que respeita a células endoteliais vasculares, são vários os receptores e respectivos ligandos que podem ser utilizados em estratégias de direccionamento de genes. A transferrina humana, por exemplo, é um ligando endógeno, e tal como outros ligandos endógenos apresenta a vantagem de não apresentar imunogenicidade. O receptor da transferrina é uma glicoproteína abundantemente expressa em células endoteliais, no cérebro, no fígado e também em células musculares. Como tal, este sistema tem sido utilizado para direccionamento a células endoteliais¹¹¹ e para o cérebro¹¹², tanto por conjugação do ligando transferrina, como pela utilização de anticorpos contra o seu receptor. Elevados níveis de expressão foram igualmente reportados em células tumorais¹¹³, razão pela qual a transferrina tem sido amplamente utilizada como estratégia de direccionamento de genes a este tipo de células^{27,114}. A utilização do ligando transferrina apresenta a desvantagem da competição exercida pela proteína endógena, facto que pode ser ultrapassado pela utilização de outros ligandos que apresentem uma afinidade para o referido receptor superior à da transferrina endógena (por exemplo, anticorpos contra o receptor).

O principal problema de direccionamento de transgenes a células vasculares tem sido contudo a falta de marcadores específicos para o endotélio patológico. Neste contexto, a injeção de fagos em ratos *nude*, apresentando tumores de cancro da mama, permitiu a identificação de três motivos em peptídeos, compatíveis com o direccionamento para o endotélio tumoral¹¹⁵.

Existem no entanto outros candidatos a considerar, tais como a tromboplastina¹¹⁶ e a factalquina¹¹⁷. Outras moléculas alvo potenciais incluem as integrinas $\alpha v \beta 3$, as quais são altamente sobre-expressas no endotélio activado¹¹⁸, os receptores do VEGF¹¹⁹ e as selectinas.

As selectinas, em particular, constituem uma família conservada de lectinas de superfície, cuja porção extracelular consiste num domínio semelhante ao factor de crescimento da epiderme. Estas glicoproteínas estão envolvidas em interacções do tipo adesivo, que ocorrem entre leucócitos, plaquetas e células endoteliais^{120,121}, e incluem a E-selectina (expressa apenas em células endoteliais), a L-selectina (que apresenta expressão confinada aos leucócitos) e a P-selectina (a qual pode ser encontrada tanto em plaquetas como em células endoteliais)¹²².

A E-selectina foi seleccionada para direccionamento de imunolipossomas pela primeira vez por Spragg e colaboradores¹²³, e apresenta como principal vantagem o facto de ser expressa em células endoteliais de um modo que é totalmente dependente da activação por moléculas inflamatórias^{123,124}, permitindo, como tal, a discriminação entre endotélio no estado fisiológico e no estado patológico.

Dos anticorpos murínicos disponíveis contra a E-selectina humana (anticorpo H18/7¹²³, anticorpo BBA26¹²⁵, anticorpo 1.2B6¹²⁶ e respectivo fragmento Fab 1.2B6¹²⁷) seleccionou-se, no âmbito desta dissertação, o anticorpo H18/7 devido à evidência de ocorrência de internalização celular após ligação às respectivas células alvo¹²⁸.

1.1.3.5. Vias de internalização celular

As células eucariotas podem apresentar várias vias de internalização, as quais podem afectar a cinética intracelular do transportador. Essas vias incluem a fagocitose e a pinocitose, incluindo-se nesta a macropinocitose, a endocitose mediada por vesículas revestidas por clatrina, a endocitose mediada por cavéolas e a endocitose não dependente de clatrina nem caveolina¹²⁹ (Figura 4).

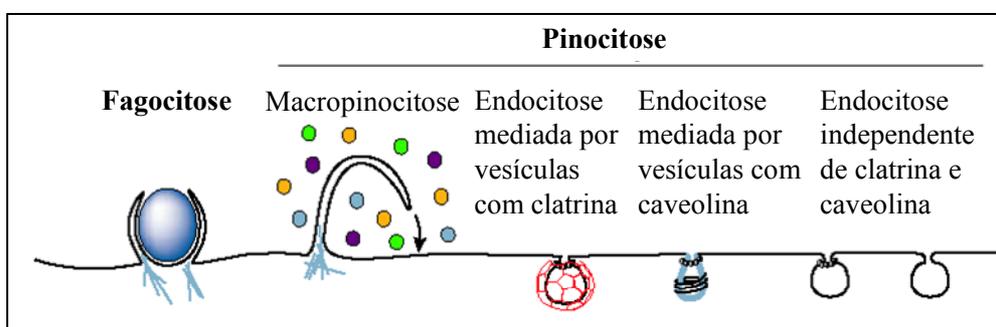


Figura 4- Representação esquemática dos processos de internalização celular

Figura adaptada do artigo "Sean D. Conner & Sandra L. Schmid; Regulated portals of entry into the cell; Nature, vol 422, 6 March 2003"

As cavéolas são invaginações em forma de balão, cuja membrana plasmática é enriquecida em colesterol e esfingolípido, sendo caracterizadas pela presença de uma proteína membrana dimérica designada caveolina. A sua internalização pode ser despoletada por ligandos que interagem com os receptores existentes nas cavéolas¹³⁰. Enquanto os resultados obtidos por Rejman e colaboradores indicam que partículas com um tamanho superior a 200 nm são internalizadas por um processo mediado por cavéolas, tornando-se esta a via predominante para partículas de 500 nm¹²⁹, o trabalho

de revisão elaborado por Conner e Schmid indica que a internalização mediada por esta via ocorre em vesículas com diâmetro entre 50 e 60 nm¹³⁰.

De acordo com os dados obtidos por Rejman e colaboradores, partículas com tamanho próximo ou inferior a 200 nm são predominantemente internalizadas por vesículas revestidas por clatrina, sendo que no caso de partículas com tamanho entre 50 e 100 nm, a internalização celular é um processo relativamente rápido com uma cinética semelhante à da internalização da transferrina. Pelo contrário, para partículas com tamanho superior, e para a mesma via de internalização, este processo ocorre de um modo significativamente mais lento¹²⁹.

1.1.3.6. Libertação dos endossomas

Após internalização celular, o destino mais frequente dos transportadores direccionados é o endossoma, e posteriormente o lisossoma, onde ocorrerá a degradação do material genético por acção enzimática. No sentido de escapar a este processo de degradação, várias têm sido as estratégias utilizadas para salvaguardar a integridade do material genético entregue, e que passam pela escolha de transportadores com capacidade de reagir face ao processo de acidificação que ocorre nos referidos organelos celulares. Entre as várias estratégias, destaca-se a utilização de lipossomas contendo o lípido DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina), o qual desempenha um papel fundamental na fusão de membranas^{131,132}. Foi demonstrado que complexos preparados a partir de lipossomas catiónicos contendo o lípido DOPE possibilitam a libertação do ADN para o citoplasma após endocitose¹³³ e que, paralelamente, a utilização de lípidos com carga negativa, tais como a fosfatidilserina, em associação com DOPE resulta igualmente na aquisição de sensibilidade ao pH¹³⁴.

Os transportadores poliméricos também procuram explorar o fenómeno da acidificação, nomeadamente através da presença de grupos químicos que sequestram protões (por exemplo, quitosano com grupos imidazol, ou polietilenimina (PEI) com grupos amina). Tal como esperado, a associação de plasmídeos à polietilenimina resulta na presença de ADN em compartimentos não lisossómicos, uma vez que este polímero causa ruptura da membrana do endossoma, permitindo a sua libertação destes organelos¹³⁵.

Paralelamente, a extensão da degradação do plasmídeo dependerá também do catabolismo do transportador. Assim, no caso da polilisina, o enanteómero D, contrariamente ao enanteómero L, é hidrolisado por peptidases celulares e,

consequentemente, a hidrólise intracelular do ADN é superior na presença do enantiómero L do que na presença do enantiómero D¹³⁵.

De modo a melhorar a libertação do ADN plasmídico, também se têm testado associações de peptídeos fusogénicos a lipoplexos, estratégia que assenta igualmente na desestabilização da membrana do endossoma durante o processo de acidificação. Neste contexto, é importante salientar que a utilização de um peptídeo derivado da subunidade HA-2 da hemaglutinina do vírus da influenza, associado aos lipoplexos, induziu um aumento da transfecção¹³⁶.

No seu conjunto, as abordagens referidas permitem reduzir a degradação do ADN ao nível do lisossoma, ao contrário do que se verifica quando as células são transfectadas com ADN na sua forma livre¹³⁶.

No que respeita aos vectores virais, especula-se que tanto os adenovírus como os vírus adeno-associados recombinantes apresentam capacidade para escapar do endossoma, a qual é conferida pelas proteínas da cápside viral.

1.1.3.7. Degradação após libertação do endossoma

São inúmeras as evidências experimentais que demonstram o reduzido tempo de meia vida do ADN livre no citoplasma¹³⁷. A presença de nucleases pode ser responsável pela degradação do transgene antes da translocação para o núcleo, pelo que durante o processo de transporte no citoplasma, este deva estar protegido pelos transportadores¹³⁷ (lípidos, polímeros ou cápsides virais).

Para além da presença de nucleases, os proteossomas também podem desempenhar uma função importante na degradação de vectores virais e não virais. Encontrando-se no citoplasma e no núcleo¹³⁸, a principal função dos proteossomas é degradar as proteínas desnecessárias ou danificadas por proteólise, as quais são marcadas para degradação por um processo designado ubiquitinação, catalizado por ligases de ubiquitina. A internalização de proteínas estranhas às células, tais como as proteínas virais, e eventualmente as proteínas utilizadas para efectuar o direccionamento dos lipossomas, pode desencadear este processo¹³⁹, levando à degradação do transportador.

1.1.3.8. Entrada no núcleo

Considera-se geralmente que após saída dos endossomas, o ADN deve migrar através do citoplasma para chegar ao núcleo, processo este que pode constituir um dos passos limitativos da eficiência de transfecção. Contudo, artigos recentes descrevem o

envolvimento de microtúbulos no transporte dos genes para regiões perinucleares, tanto em complexos de PEI/ADN, como em certos vectores virais, transporte este que ocorre em poucos minutos¹⁴⁰. Este resultado coloca em questão a hipótese vulgarmente aceite de que a difusão no citoplasma do ADN para a zona perinuclear, em sistemas não virais, consiste num processo aleatório e lento¹⁴¹, salientando que a chegada ao núcleo não constitui o passo limitativo da transfecção mediada por complexos de PEI/ADN em células CHO¹⁴⁰.

Os resultados obtidos demonstraram que o transporte activo referido pode ocorrer de dois modos distintos: (i) em endossomas, os quais são submetidos a um movimento dirigido por proteínas e guiado por microtúbulos, ou (ii) por associação física dos poliplexos com as proteínas directamente ligadas aos microtúbulos. Deste modo, não é de excluir que os complexos de PEI/ADN possam utilizar os mesmos mecanismos eficientes de transporte citoplasmático que os vírus, tais como os adenovírus e os vírus adeno-associados. Enquanto os adenovírus escapam do endossoma e subsequentemente se associam à proteína dineína, a qual medeia o movimento em direcção à extremidade do microtúbulo localizado perto do núcleo, especula-se que os vírus adeno-associados, por oposição, possam atingir a região perinuclear ainda em endossomas. Neste caso, os endossomas são activamente transportados por microtúbulos, saindo estes vírus destas vesículas antes de entrar no núcleo, à semelhança do que provavelmente acontece com os complexos de PEI/ADN¹⁴⁰.

Após atingir a região perinuclear, os transgenes têm de entrar no núcleo, o que constitui uma barreira significativa a ultrapassar. Provavelmente por esse motivo, para se obter os mesmos níveis de transfecção após microinjecção de 100 cópias de plasmídeo no núcleo, é necessário injectar no citoplasma 100 a 1000 vezes mais plasmídeos¹⁴².

É conhecido que o envelope nuclear é uma estrutura composta pelas membranas nuclear interna e externa, as quais se encontram separadas pelo espaço perinuclear¹⁴³. A continuidade destas estruturas permite apenas a difusão passiva de proteínas com tamanho inferior a 60 kDa¹⁴³, sendo que, para tamanhos superiores, a internalização deve ocorrer por um processo activo, envolvendo os complexos do poro nuclear (Figura 5).

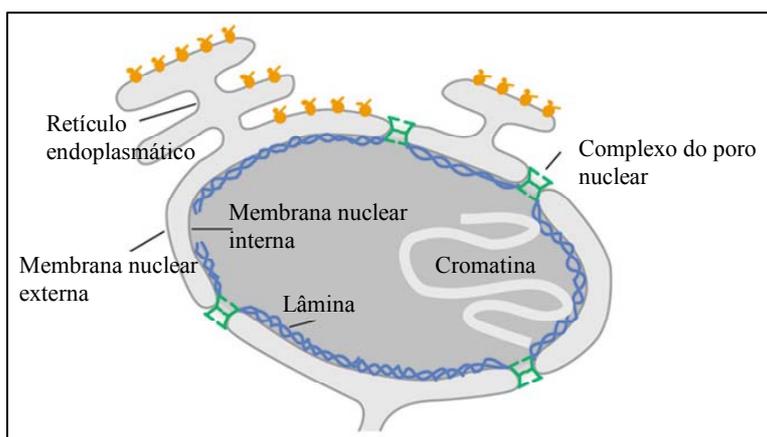


Figura 5- Representação esquemática de um núcleo celular

Adaptado de imagem original do site da Internet

<http://genomebiology.com/2002/3/4/REVIEWS/1008/figure/F1>

Por esse motivo, a principal estratégia utilizada para aumentar a internalização nuclear de plasmídeos, tem consistido na associação de sinais de localização nuclear (NLS) ao ADN. Este procedimento teve como base a observação de que certas proteínas, detentoras destes sinais, apresentam a propriedade de serem activamente translocadas para o núcleo¹⁴⁴.

Contudo, os canais criados pelos complexos do poro nuclear apresentam um tamanho máximo de 30 nm¹⁴⁵ e, como tal, são demasiado pequenos para permitir a passagem da maioria dos complexos de PEI/ADN. Pelo contrário, em células mitóticas a ruptura temporária da membrana nuclear facilita a entrada dos transportadores de genes para o espaço nuclear¹⁴⁰. No entanto, vírus como os adenovírus e os adeno-associados são capazes de transduzir células que não se dividem. Neste sentido, pode especular-se que: (i) após descapsidação perto do núcleo, o ADN viral seja translocado por acção de nucleoproteínas contendo NLS covalentemente ligadas ao ADN viral¹⁴⁶; (ii) proteínas catiónicas, semelhantes a histonas, existentes no núcleo viral, e ligadas por associação electrostática ao ADN viral, medeiam a sua internalização¹⁴²; (iii) o ADN viral contenha sequências que, após dissociação da cápside, ligam a nucleoproteínas das células hospedeiras, resultando no seu transporte para o núcleo¹⁴⁷.

1.1.3.9. Dissociação dos lípidos, polímeros e descapsidação

Uma questão importante que deve ser respondida está relacionada com o grau de condensação/compactação do material genético quando este chega ao núcleo. Conforme foi sugerido anteriormente, parece evidente que a associação do ADN ao transportador

pode ser útil até esta fase, não só por diminuir o tamanho do plasmídeo, mas também por conferir protecção contra nucleases citoplasmáticas. Neste contexto, importa referir que a microinjecção de lipoplexos directamente no núcleo de oócitos não resulta na expressão do transgene, ao contrário do observado aquando da injecção do plasmídeo isoladamente, sugerindo que a presença de lípidos associados ao ADN nesta fase inibe a transcrição¹⁴⁸. Como tal, de acordo com estes resultados, seria desejável ter o ADN dissociado do transportador previamente à sua entrada no núcleo. Contrariamente aos resultados obtidos com os lipoplexos, o polímero polietilenimina (PEI), quando injectado no núcleo enquanto complexado com o ADN plasmídico, não inibe a transfecção¹⁴⁹, e como tal parece constituir uma excepção ao caso anteriormente apresentado. Adicionalmente, os resultados obtidos por Cornelis¹⁵⁰ indicam que determinados lipossomas catiónicos apresentam a propriedade de se dissociar do ADN plasmídico após entrada no núcleo e, como tal, este processo não constitui um factor limitativo da actividade de transfecção, nas condições experimentais testadas.

A título especulativo pode considerar-se que as histonas desempenhem uma função importante na competição com os transportadores catiónicos pelos plasmídeos, como forma de conseguir a dissociação dos complexos após internalização no núcleo.

1.1.3.10. Mecanismos moleculares de silenciamento dos transgenes

Os organismos eucariotas desenvolveram mecanismos para manutenção da integridade genómica e para prevenção da expressão de proteínas anormais ou estranhas. Os transgenes integrados por meios virais são acompanhados da perda de expressão ao longo do tempo, principalmente devido à metilação de citosinas por metiltransferases de ADN. Esta transformação impede a ligação de factores de transcrição, levando à formação de estruturas de cromatina silenciadas no que respeita à transcrição¹⁵¹.

Este fenómeno não é limitado a transgenes integrados, uma vez que a metiltransferase de ADN também pode actuar em plasmídeos episomais¹⁵².

No que respeita à utilização de plasmídeos, importa referir que a frequência de dinucleótidos citosina guanosina (CpG) é maior nas bactérias do que nos mamíferos, encontrando-se bem estabelecido que o ADN com motivos CpG não metilados é altamente imunogénico¹⁵³. Estes motivos, quando complexados com lípidos catiónicos, podem desencadear respostas agudas inflamatórias, facto que pode adicionalmente potenciar a perda de expressão do transgene *in vivo*.

Ainda neste contexto, os resultados obtidos por Chen e colaboradores¹⁵⁴ indicam que o silenciamento do transgene em plasmídeos é mediado pela proximidade entre a cassete de expressão e os elementos de ADN bacterianos. Nesse sentido, têm-se utilizado sistemas de recombinação de fagos para produzir minicírculos sem ADN bacteriano^{155,156}, resultando em vectores que apresentam um nível de expressão do transgene até 560 vezes superior ao do ADN bacteriano convencional¹⁵⁶.

1.1.3.11. Processamento da transcrição

A regulação da expressão génica reveste-se de uma importância elevada, quando se pretende limitar a expressão de transgenes em determinados locais, recorrendo para tal a promotores específicos do tecido. A regulação do processo de transcrição faz igualmente sentido quando se utilizam vectores virais que induzem uma expressão do transgene a longo termo. Nestes casos, a utilização de sistemas *on/off* que são activados ou desactivados na presença de determinadas moléculas (por exemplo, tetraciclina), permitem a expressão do transgene em momentos definidos pelo protocolo clínico, pela simples administração de substâncias que activam ou desactivam o promotor em causa¹⁵⁷.

1.1.3.12. Indução de resposta imunitária

Os transportadores utilizados devem apresentar características que lhes permitam atenuar ou evitar a resposta humoral e celular do sistema imunitário. Neste âmbito, tem sido descrito que a transfecção mediada por lípidos carregados induz uma resposta forte por parte das citocinas¹⁵⁸. Adicionalmente, devido à tendência para a agregação, os lipossomas catiónicos são eliminados rapidamente após administração intravenosa, principalmente devido à retenção mediada pelo sistema retículo-endotelial¹⁵⁹. Outros autores reportaram a ocorrência de uma resposta imunitária, observada após administração de lipossomas contendo o polímero PEG, a qual é potenciada quando estes transportam ADN, resultando na eliminação rápida de doses subsequentes dos transportadores^{160,161}. Curiosamente, este efeito demonstrou ser independente de sequências, tais como motivos CpG imuno-estimuladores já referidos, sendo a resposta dirigida especificamente contra o conjugado PEG-lípido¹⁶¹.

Adicionalmente, as células transduzidas podem funcionar como células apresentadoras de antigénios, levando ao seu reconhecimento por parte de células efectoras, e respectiva lise.

Este tema será desenvolvido de um modo mais contextualizado no Capítulo 6 desta dissertação.

1.1.4. Características essenciais do transportador de genes

O principal objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um nanotransportador para entrega de genes especificamente a células endoteliais activadas, conferindo-lhe simultaneamente características adequadas para administração intravenosa. Face ao referido, o principal desafio no desenvolvimento dos transportadores consistiu em ultrapassar algumas das barreiras anteriormente mencionadas, mantendo a eficiência de entrega do transgene às células alvo.

Assim, de modo a ultrapassar a interacção não específica dos transportadores com células e com proteínas séricas, optou-se, neste trabalho, por utilizar lípidos neutros e/ou com carga negativa. Adicionalmente, procedeu-se à introdução do polímero polietilenoglicol (PEG) na composição da formulação, na expectativa de aumentar significativamente o tempo de circulação sanguínea do transportador¹⁶².

Como consequência das propriedades físico-químicas dos transportadores exigidas pela via de administração intravenosa, nomeadamente a carga e o tamanho, a encapsulação das moléculas de ADN, ou de outras partículas de elevado tamanho, nos lipossomas, encontra-se comprometida, resultando em níveis de encapsulação muito baixos^{163,164}. Por esse motivo, procedeu-se à pré-condensação do ADN com polietilenimina, previamente à associação com os lipossomas, resultando na formação de nanotransportadores designados lipopoliplexos (LPPX). A pré-condensação com um polímero, combinada com a presença de lipossomas, apresenta ainda o objectivo de proteger o material genético contra a degradação mediada por nucleases existentes no soro e nos tecidos.

Tal como referido anteriormente, o tamanho dos nanotransportadores influencia não só a sua biodistribuição, mas também condiciona o processo de internalização celular^{165,129}. Neste sentido, o tamanho dos LPPX foi modulado por extrusão, esperando-se adicionalmente uma estabilidade elevada, como consequência das suas dimensões reduzidas, da ausência de lípidos de carga positiva e da presença de PEG^{166,167}.

Na expectativa de conferir selectividade aos transportadores não catiónicos conjugados com PEG, procedeu-se à inclusão de ligandos neste sistema, para assim

promover a interacção com as células alvo. Esta interacção deve caracterizar-se por uma elevada afinidade e induzir a internalização celular dos transportadores.

Especula-se que após a internalização dos transgenes, a sua libertação do endossoma e o seu trajecto até ao núcleo seja facilitada pela presença de PEI pois, tal como referido, a complexação é uma forma de evitar a degradação citoplasmática do material genético. A entrada do transgene no núcleo constitui um parâmetro crítico em terapia génica, especulando-se que a utilização de polímeros como o PEI também poderá desempenhar um papel importante promovendo a protecção do ADN e facilitando a sua translocação através da membrana nuclear. Após internalização nuclear, a extensão e duração da expressão do transgene dependerá da construção do plasmídeo, e da maior ou menor facilidade de dissociação do complexo.

Após revisão das principais características dos vectores actualmente disponíveis em terapia génica, e das potenciais abordagens terapêuticas de patologias envolvendo células endoteliais, procedeu-se a uma análise geral das principais barreiras que a formulação a desenvolver deverá ultrapassar para permitir o transporte e entrega de genes especificamente a células alvo. Do cruzamento das informações anteriores, resultou um conjunto de linhas de orientação respeitantes à composição e características que os vectores a desenvolver deverão apresentar, e que constituíram a base que serviu de suporte à fase inicial dos estudos descritos nesta dissertação.

1.2. Bibliografia

- 1 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249-257.
- 2 Bhaskar V *et al.* E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 6387-6394.
- 3 Koning GA, Schiffelers RM, Storm GJ. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. *Endothelium* 2002; **9**: 161-171.
- 4 Middleton J *et al.* Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: 60-72.
- 5 Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; **66**: 232-245.
- 6 Zund G *et al.* Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 7075-7080.
- 7 Papapetrou EP, Zoumbos NC, Athanassiadou Aj. Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems: past progress and future prospects. *Gene Ther* 2005; **12 Suppl 1**: S118-130.

- 8 Wang Z *et al.* Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004; **11**: 711-721.
- 9 Kapsa R *et al.* In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 629-642.
- 10 Voziyanov Y, Pathania S, Jayaram M. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 930-941.
- 11 Glover DJ, Lipps HJ, Jans DAJ. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 299-310.
- 12 Huser D, Weger S, Heilbronn R. Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J Virol* 2002; **76**: 7554-7559.
- 13 Humme S *et al.* The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 10989-10994.
- 14 Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 5665-5678.
- 15 Mazda O, Satoh E, Yasutomi K, Imanishi J. Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors. *J Immunol Methods* 1997; **204**: 143-151.
- 16 Belt PB *et al.* Efficient cDNA cloning by direct phenotypic correction of a mutant human cell line (HPRT-) using an Epstein-Barr virus-derived cDNA expression vector. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 4861-4866.
- 17 Mazda O. Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr Gene Ther* 2002; **2**: 379-392.
- 18 Yates JL, Guan N. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* 1991; **65**: 483-488.
- 19 Papapetrou EP *et al.* Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 2006; **13**: 40-51.
- 20 Piechaczek C *et al.* A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 426-428.
- 21 Jenke AC, Scinteie MF, Stehle IM, Lipps HJ. Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Mol Biol Rep* 2004; **31**: 85-90.
- 22 Crook K, McLachlan G, Stevenson BJ, Porteous DJ. Plasmid DNA molecules complexed with cationic liposomes are protected from degradation by nucleases and shearing by aerosolisation. *Gene Ther* 1996; **3**: 834-839.
- 23 Crook K, Stevenson BJ, Dubouchet M, Porteous DJ. Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum. *Gene Ther* 1998; **5**: 137-143.
- 24 Egilmez NK, Iwanuma Y, Bankert RB. Evaluation and optimization of different cationic liposome formulations for in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**: 169-173.
- 25 Taniyama Y *et al.* Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular

- mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 2001; **104**: 2344-2350.
- 26 Hyde SC *et al.* Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 2000; **7**: 1156-1165.
- 27 Kircheis R *et al.* Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* 1999; **1**: 111-120.
- 28 Nomura T *et al.* Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors. *Pharm Res* 1998; **15**: 128-132.
- 29 Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4429-4432.
- 30 Cotten M *et al.* Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 4033-4037.
- 31 Uike H *et al.* Efficiency of targeted gene delivery of ligand-poly-L-lysine hybrids with different crosslinks. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; **62**: 1247-1248.
- 32 Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 4255-4259.
- 33 Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DA. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000; **67**: 598-606.
- 34 Chen J, Gamou S, Takayanagi A, Shimizu N. A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett* 1994; **338**: 167-169.
- 35 Zanta MA, Boussif O, Adib A, Behr JP. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug Chem* 1997; **8**: 839-844.
- 36 Erbacher P, Remy JS, Behr JP. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 1999; **6**: 138-145.
- 37 Diebold SS *et al.* Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 775-786.
- 38 Wang S *et al.* Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 3318-3322.
- 39 Cheng PW. Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 275-282.
- 40 Yu W *et al.* A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene. *Gene Ther* 2004; **11**: 1434-1440.
- 41 Schaffer DV, Lauffenburger DA. Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28004-28009.
- 42 Roelvink PW, Kovesdi I, Wickham TJ. Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J Virol* 1996; **70**: 7614-7621.

- 43 Roelvink PW *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998; **72**: 7909-7915.
- 44 Wickham TJ, Filardo EJ, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol* 1994; **127**: 257-264.
- 45 Yla-Herttuala S, Martin JFj. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000; **355**: 213-222.
- 46 Brody SL *et al.* Acute responses of non-human primates to airway delivery of an adenovirus vector containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 821-836.
- 47 Jooss K, Ertl HC, Wilson JM. Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol* 1998; **72**: 2945-2954.
- 48 Kaplan JM *et al.* Humoral and cellular immune responses of nonhuman primates to long-term repeated lung exposure to Ad2/CFTR-2. *Gene Ther* 1996; **3**: 117-127.
- 49 Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 2004; **11 Suppl 1**: S10-17.
- 50 Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995; **69**: 2004-2015.
- 51 Wohlfart C. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *J Virol* 1988; **62**: 2321-2328.
- 52 Toogood CI, Crompton J, Hay RT. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* 1992; **73 (Pt 6)**: 1429-1435.
- 53 Steel JC *et al.* Modification of liposomal concentration in liposome/adenoviral complexes allows significant protection of adenoviral vectors from neutralising antibody, in vitro. *J Virol Methods* 2005; **126**: 31-36.
- 54 Merten OW, Geny-Fiamma C, Douar AMj. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* 2005; **12 Suppl 1**: S51-61.
- 55 Vandenberghe LH, Wilson JM. AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* 2007; **7**: 325-333.
- 56 Manno CS *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; **12**: 342-347.
- 57 Milot E, Belmaaza A, Rassart E, Chartrand P. Association of a host DNA structure with retroviral integration sites in chromosomal DNA. *Virology* 1994; **201**: 408-412.
- 58 Hwang LH, Gilboa E. Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection. *J Virol* 1984; **50**: 417-424.
- 59 Flugelman MY *et al.* Low level in vivo gene transfer into the arterial wall through a perforated balloon catheter. *Circulation* 1992; **85**: 1110-1117.
- 60 Nabel EG. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995; **91**: 541-548.
- 61 Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; **300**: 1749-1751.

- 62 Schroder AR *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002; **110**: 521-529.
- 63 Woods NB *et al.* Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 2003; **101**: 1284-1289.
- 64 Hacein-Bey-Abina S *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; **348**: 255-256.
- 65 Hacein-Bey-Abina S *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; **302**: 415-419.
- 66 Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *Science in medicine* 2007; **117**: 1456-1465.
- 67 Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr Opin Hematol* 2007; **14**: 337-342.
- 68 Skobe M *et al.* Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997; **3**: 1222-1227.
- 69 Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 1996; **275**: 150-154.
- 70 O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996; **2**: 689-692.
- 71 Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; **74**: 111-122.
- 72 Brooks PC *et al.* Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1815-1822.
- 73 Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 672-677.
- 74 Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; **390**: 404-407.
- 75 Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999; **84**: 643-650.
- 76 Cascinu S *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2803-2807.
- 77 Millauer B *et al.* Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res* 1996; **56**: 1615-1620.
- 78 Goldman CK *et al.* Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 8795-8800.
- 79 Prewett M *et al.* Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999; **59**: 5209-5218.
- 80 Thurston G *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; **286**: 2511-2514.
- 81 Laitinen M *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 1481-1486.
- 82 Rosengart TK *et al.* Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121

- cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; **100**: 468-474.
- 83 Baumgartner I *et al.* Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; **97**: 1114-1123.
- 84 Isner JM *et al.* Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; **28**: 964-973; discussion 973-965.
- 85 Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev* 1997; **13**: 37-50.
- 86 Nabel EG *et al.* Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; **362**: 844-846.
- 87 Hedman M *et al.* Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003; **107**: 2677-2683.
- 88 Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 2005; **90**: 315-326.
- 89 Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; **5**: 40-46.
- 90 Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001; **125**: 67-71.
- 91 Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. A novel angiogenesis inhibitor suppresses rat adjuvant arthritis. *Cell Immunol* 1995; **160**: 178-184.
- 92 Storgard CM *et al.* Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest* 1999; **103**: 47-54.
- 93 Bennett CF *et al.* Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* 1994; **152**: 3530-3540.
- 94 Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 9784-9788.
- 95 Woods JM *et al.* IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol* 2001; **166**: 1214-1222.
- 96 Escriou V *et al.* Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1368**: 276-288.
- 97 Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Jr., Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1437-1446.
- 98 Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC, Jr. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1390**: 119-133.
- 99 Li S *et al.* Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol* 1999; **276**: L796-804.

- 100 Ogris M *et al.* PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; **6**: 595-605.
- 101 Eliyahu H, Servel N, Domb AJ, Barenholz Yj. Lipoplex-induced hemagglutination: potential involvement in intravenous gene delivery. *Gene Ther* 2002; **9**: 850-858.
- 102 Kopatz I, Remy JS, Behr JP. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 2004; **6**: 769-776.
- 103 Ruponen M, Yla-Herttuala S, Urtti A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1415**: 331-341.
- 104 Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1190**: 99-107.
- 105 Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1104**: 95-101.
- 106 Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1029**: 91-97.
- 107 Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1113**: 171-199.
- 108 Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004; **303**: 1818-1822.
- 109 Lauffenburger DA LJ. *Receptors*: New York, 1993.
- 110 Das M, Fox CF. Molecular mechanism of mitogen action: processing of receptor induced by epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; **75**: 2644-2648.
- 111 Tan PH *et al.* Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation* 2001; **71**: 552-560.
- 112 Zhang Y, Zhu C, Pardridge WMj. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther* 2002; **6**: 67-72.
- 113 Gatter KC *et al.* Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 1983; **36**: 539-545.
- 114 Xu L *et al.* Self-assembly of a virus-mimicking nanostructure system for efficient tumor-targeted gene delivery. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 469-481.
- 115 Koivunen E *et al.* Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 768-774.
- 116 Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 1996; **2**: 167-168.
- 117 Umehara H *et al.* Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol* 2001; **22**: 602-607.
- 118 Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 237-268.
- 119 Tille JC *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 2003; **285**: 286-298.
- 120 Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; **76**: 301-314.

- 121 Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; **88**: 3259-3287.
- 122 Watson ML *et al.* Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 1990; **172**: 263-272.
- 123 Spragg DD *et al.* Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 8795-8800.
- 124 Stocker CJ *et al.* TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J Immunol* 2000; **164**: 3309-3315.
- 125 Bendas G *et al.* Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm* 1999; **181**: 79-93.
- 126 Wellicome SM *et al.* A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J Immunol* 1990; **144**: 2558-2565.
- 127 Jamar F *et al.* Scintigraphy using a technetium 99m-labelled anti-E-selectin Fab fragment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; **41**: 53-61.
- 128 Everts M *et al.* In vitro cellular handling and in vivo targeting of E-selectin-directed immunoconjugates and immunoliposomes used for drug delivery to inflamed endothelium. *Pharm Res* 2003; **20**: 64-72.
- 129 Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra Dj. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; **377**: 159-169.
- 130 Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; **422**: 37-44.
- 131 Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CP. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids* 1986; **40**: 127-144.
- 132 Pires P *et al.* Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1418**: 71-84.
- 133 Simoes S *et al.* Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; **2**: 237-254.
- 134 Hope MJ, Walker DC, Cullis PR. Ca²⁺ and pH induced fusion of small unilamellar vesicles consisting of phosphatidylethanolamine and negatively charged phospholipids: a freeze fracture study. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **110**: 15-22.
- 135 Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot Mj. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; **41**: 201-208.
- 136 Stegmann T *et al.* Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *Embo J* 1987; **6**: 2651-2659.
- 137 Lechardeur D *et al.* Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999; **6**: 482-497.
- 138 Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7709-7718.
- 139 Denby L, Nicklin SA, Baker AHj. Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* 2005; **12**: 1534-1538.

- 140 Suh J, Wirtz D, Hanes J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 3878-3882.
- 141 Lukacs GL *et al.* Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000; **275**: 1625-1629.
- 142 Pouton CWj. Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **34**: 51-64.
- 143 Csermely P, Schnaider T, Szanto Ij. Signalling and transport through the nuclear membrane. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**: 425-451.
- 144 Mosammaparast N *et al.* Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* 2001; **153**: 251-262.
- 145 Nigg EA. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 1997; **386**: 779-787.
- 146 Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; **75**: 477-486.
- 147 Dean DA. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* 1997; **230**: 293-302.
- 148 Zabner J *et al.* Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18997-19007.
- 149 Pollard H *et al.* Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7507-7511.
- 150 Cornelis S, Vandenbranden M, Ruyschaert JM, Elouahabi A. Role of intracellular cationic liposome-DNA complex dissociation in transfection mediated by cationic lipids. *DNA Cell Biol* 2002; **21**: 91-97.
- 151 Grassi G *et al.* Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 2003; **24**: 1625-1635.
- 152 Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 8211-8218.
- 153 Krieg AM *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; **374**: 546-549.
- 154 Chen ZY, He CY, Meuse L, Kay MAj. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 2004; **11**: 856-864.
- 155 Bigger BW *et al.* An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23018-23027.
- 156 Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; **8**: 495-500.
- 157 Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5547-5551.
- 158 Bailey AL, Sullivan SM. Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1468**: 239-252.
- 159 Gabizon A, Papahadjopoulos D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1103**: 94-100.

-
- 160 Judge A, McClintock K, Phelps JR, Maclachlan I. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Mol Ther* 2006; **13**: 328-337.
- 161 Semple SC *et al.* Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312**: 1020-1026.
- 162 Woodle MC *et al.* Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1105**: 193-200.
- 163 Mannino RJ, Allebach ES, Strohl WA. Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles. Dependence on the size of the DNA. *FEBS Lett* 1979; **101**: 229-232.
- 164 Dimitriadis GJ. Entrapment of plasmid DNA in liposomes. *Nucleic Acids Res* 1979; **6**: 2697-2705.
- 165 Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez Sj. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* 2005; **12**: 1734-1751.
- 166 Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; **268**: 235-237.
- 167 Allen TM *et al.* Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1066**: 29-36.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de nanotransportadores para
entrega direccionada de transgenes a células
humanas

2.1. Introdução

Conforme referido no Capítulo 1 desta dissertação, os sistemas catiónicos, frequentemente utilizados como agentes de transfecção, apresentam características que, de um modo geral, os tornam inadequados para administração por via intravenosa. Com o objectivo de ultrapassar essas limitações, têm sido desenvolvidas estratégias alternativas para modular as suas propriedades, nomeadamente através da encapsulação de ADN pré-condensado com agentes catiónicos, em lipossomas neutros ou carregados negativamente¹. Esta estratégia permite não só mascarar a carga positiva dos complexos, eliminando interacções não específicas com proteínas e células sanguíneas, mas também, promover a encapsulação do ADN em lipossomas neutros ou de carga negativa, uma vez que a condensação diminui o volume ocupado pelo ADN plasmídico. Neste sentido, têm sido utilizados vários agentes catiónicos, alguns com o objectivo único de condensar o ADN, tais como o peptídeo protamina², a poliamina espermina³, o catião cálcio^{4,5} e outros, apresentando propriedades adicionais, tais como o direccionamento nuclear, apresentado pelo conjugado NLS-H1 (sinal de localização nuclear (NLS) do antígeno T do vírus SV40, conjugado com a histona humana H1)⁶, ou com a capacidade de facilitar a libertação do ADN dos endossomas para o espaço intracelular, tal como a polietilenimina (PEI)^{7,8}.

Neste trabalho, seleccionou-se como agente de condensação do ADN a polietilenimina (Figura 2.1) pois, tal como referido, este polímero apresenta propriedades que permitem simultaneamente condensar o ADN e facilitar a sua saída do endossoma, etapas, que à luz do conhecimento actual, são determinantes para a eficácia do processo de transfecção. Estas propriedades devem-se essencialmente ao facto do polímero possuir uma densidade de grupos amina bastante elevada, os quais se encontram apenas parcialmente protonados ao pH fisiológico^{9,10}. Após internalização nas células, e aquando do processo de acidificação que ocorre nos endossomas ou endolisossomas, os prótons são captados pelos grupos amina do polímero PEI, impedindo a diminuição do pH naquele organelo celular. Deste modo, continua a verificar-se a entrada de prótons, a qual é acompanhada do influxo de iões cloreto. O movimento deste ião induz por sua vez o influxo de água, causando turgidez osmótica e subsequente ruptura do endossoma, permitindo que os poliplexos escapem para o citosol⁹. Por este motivo, o polímero PEI é frequentemente designado por esponja de prótons, característica que lhe confere o efeito tampão. A estrutura ramificada do

polímero, contendo aminas primárias, secundárias e terciárias, confere-lhe o atributo de exercer o efeito tampão ao longo de uma vasta gama de valores de pH¹¹.

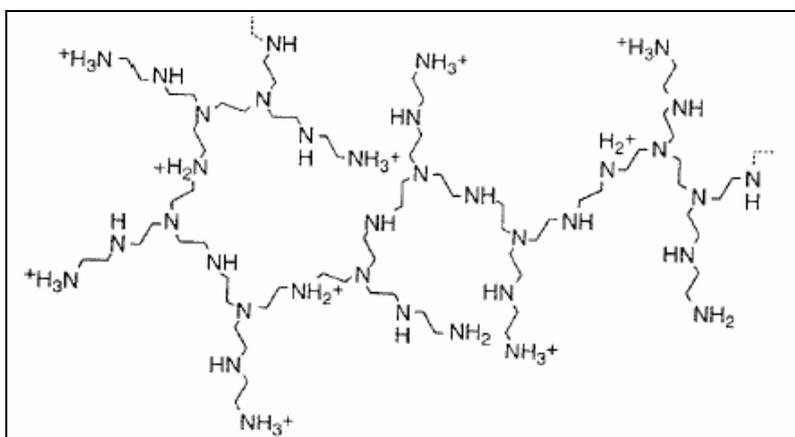


Figura 2.1- Estrutura química da polietilenimina ramificada

As moléculas de PEI podem ser sintetizadas de modo a apresentar diferentes pesos moleculares, sendo geralmente classificadas como PEI de elevado peso molecular (HMW-PEI) ou PEI de baixo peso molecular (LMW-PEI), sendo que estas últimas demonstraram ser menos citotóxicas em pelo menos uma ordem de grandeza, do que as moléculas de PEI de elevado peso molecular¹². Adicionalmente, o seu grau de ramificação também pode variar, sendo classificadas em PEI linear ou PEI ramificado¹³.

A eficácia de transfecção *in vitro*, mediada por poliplexos compostos por PEI, criou grandes expectativas para a sua utilização em terapia génica. No entanto, à semelhança do que foi descrito para os lipossomas catiónicos, a presença de cargas positivas à superfície dos poliplexos é um factor limitativo à sua administração *in vivo*, particularmente pela via intravenosa. No sentido de mascarar a carga positiva, alguns grupos de investigadores optaram por acoplar moléculas de PEG directamente às moléculas de PEI, previamente à complexação com o ADN¹⁴. Contudo, esta estratégia pode interferir com a estabilidade dos complexos, uma vez que o conjugado PEI-PEG se torna menos eficiente a condensar o plasmídeo quando comparado com o polímero PEI isoladamente¹⁴. Esta diminuição da eficiência de condensação pode ser responsável pela desestabilização dos poliplexos *in vivo*, à semelhança do que foi demonstrado para moléculas de ODN (oligodesoxinucleótidos). Assim, a presença de PEG conjugado com o polímero PEI, sendo menos eficiente a complexar os ODNs, levou à instabilidade dos complexos após administração *in vivo*, e consequentemente as moléculas de ODN foram eliminadas da circulação sanguínea mais rapidamente do que no caso da utilização de

moléculas de PEI sem PEG¹⁵. Estes resultados constituíram motivos adicionais, para que neste trabalho se tenha optado por efectuar primeiramente a condensação do ADN com o polímero PEI, e só posteriormente procedido à encapsulação dos poliplexos resultantes em lipossomas, com o objectivo de dissimular a carga associada aos poliplexos.

Nesse sentido, podem indicar-se outros trabalhos em que, alternativamente à conjugação de PEG aos polímeros, se procedeu à mistura de lipossomas pré formados com os poliplexos^{1,16,17}. Neste projecto, optámos por testar outros procedimentos que não a simples mistura, na expectativa de promover a encapsulação dos poliplexos em lipossomas, em detrimento da complexação. Mais concretamente, testaram-se métodos em que a formação das vesículas lipídicas ocorre já na presença do material a encapsular, tendo-se comparado os valores da eficiência de recuperação do ADN resultante do método (A) evaporação de fase reversa (REV); (B) congelamento/descongelamento dos lipossomas após hidratação directa do filme lipídico com a suspensão contendo os poliplexos (FT); (C) combinação da evaporação de fase reversa seguida de congelamento/descongelamento dos lipossomas (REV-FT) e (D) hidratação directa do filme lipídico com a suspensão contendo os poliplexos (hidratação). A composição dos filmes lipídicos foi seleccionada com base nas características individuais dos lípidos constituintes. Assim, o lípido DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) foi seleccionado, uma vez que se encontra descrito que este desempenha uma função importante na desestabilização da membrana do endosoma¹⁸, tendo-se utilizado também o colesterol como lípido adjuvante, uma vez que se encontra descrito que este confere estabilidade aos lipossomas face à desestabilização mediada pelo soro¹⁹. O lípido EPC (fosfatidilcolina de ovo) é igualmente conhecido por estabilizar a bicamada lipídica, e foi utilizado para diminuir a quantidade parcial de DOPE e colesterol utilizada, com o objectivo de minimizar a activação do complemento mediada pelos lípidos referidos^{20,21}. Sempre que se considerou necessário, o filme lipídico foi preparado na presença de PI (fosfatidilinositol) de modo a conferir carga negativa aos lipossomas, com o objectivo principal de aumentar a eficácia da associação dos poliplexos. Ambas as composições referidas cumprem o requisito principal que consiste na ausência de lípidos com carga positiva.

No sentido de conferir especificidade de acção a vectores do tipo não viral (incluindo poliplexos, lipoplexos, ou lipopolioplexos) são várias as estratégias descritas

na literatura envolvendo a associação electrostática de ligandos²² ou o seu acoplamento covalente à superfície dos vectores²³ (quer por ligação directa, quer através da sua ligação à extremidade distal de polímeros hidrofílicos, nomeadamente PEG). A transferrina, por exemplo, para além de conferir direccionamento^{23,24}, demonstrou induzir um aumento de várias centenas de vezes na transfecção mediada por poliplexos²⁵.

Para além da transferrina, muitos outros ligandos têm sido utilizados tais como anticorpos anti-receptor de EGF²⁶ e anti-ErbB2²⁷.

O principal objectivo dos estudos descritos neste capítulo consistiu no desenvolvimento de uma nova formulação de vectores não virais, em que se procurou incorporar soluções técnicas e científicas que permitissem dar resposta às necessidades previamente identificadas, nomeadamente: (i) condensação eficiente do ADN; (ii) protecção do material genético; (iii) redução de interacções não-específicas; (iv) propriedades físico-químicas adequadas para administração intravenosa; (v) longos tempos de circulação e (vi) capacidade de entrega específica e eficiente dos genes transportados às células alvo. Para demonstração do conceito optou-se por utilizar o ligando transferrina (holo-transferrina humana).

A preparação da nova formulação envolve três etapas principais: na primeira etapa o ADN é complexado com PEI, na segunda etapa os poliplexos resultantes são associados a lipossomas neutros ou negativos, originando os lipopoliplexos (LPPX) e, finalmente, procede-se ao acoplamento do polímero PEG aos LPPX, seguido do acoplamento do ligando transferrina ao terminal distal das moléculas de PEG.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Purificação do ADN plasmídico

As bactérias *Escherichia coli* foram transformadas com o plasmídeo pCMV-SPORT-LacZ (Gibco BRL) e semeadas em caixa de Petri, após o que se seleccionaram colónias desenvolvidas, procedendo-se ao seu crescimento em meio LB com um antibiótico adequado. Após se atingir uma densidade correspondente a 3 g de bactérias/L, sujeitou-se a suspensão celular a ultra-centrifugação a 6000 g durante 15

minutos. Após este procedimento, procedeu-se à purificação do plasmídeo utilizando o *kit* Qiagen Plasmid (Qiagen).

2.2.2. Preparação de poliplexos

Os poliplexos foram preparados por mistura de uma solução contendo ADN plasmídico (pCMV SPORT LacZ), a igual volume de outra solução contendo o polímero PEI de 2,7 kDa (T. Merden, Marburgh University), ambas com glicose (Sigma) a 5 %. A concentração final do PEI foi definida em função da razão entre os grupos amina do PEI e os grupos fosfato do ADN, representada por N/P, sendo que 43,1 g de PEI correspondem 1 mol de grupos amina e 330 g de ADN correspondem a 1 mol de grupos fosfato.

2.2.3. Medição dos tamanhos

O tamanho dos poliplexos foi medido por espectroscopia de correlação fotónica, num aparelho designado PCS Submicron Particle Size Analyser (Beckman Coulter). As medições foram realizadas a 25 °C, após um tempo de equilíbrio de 5 minutos, durante 200 segundos, com um ângulo de leitura a 90°.

2.2.4. Acessibilidade do brometo de etídio ao ADN

O teste de acessibilidade do brometo de etídio (BrEt) (Sigma) ao ADN foi efectuado em poliplexos preparados por complexação do ADN com PEI na razão molar N/P de 38, tendo-se obtido uma concentração final de ADN de 100 µg/mL. Os complexos, preparados na presença de glicose a 5 %, foram de seguida diluídos 15 vezes em tampão HBS (tampão HEPES salino), para um volume final de 1,5 mL, e subsequentemente adicionados a um volume de 0,5 mL de uma solução contendo brometo de etídio na concentração de 1,6 µg/mL. Paralelamente, procedeu-se à análise da fluorescência de uma solução de poliplexos, os quais foram diluídos 15 vezes em tampão HBS contendo PMAA (ácido poli-metacrilico) (Sigma) na concentração final de 200 µM, e incubados com este reagente durante 1 hora, sendo posteriormente incubados com um volume de 0,5 mL da referida solução de brometo de etídio. A solução controlo consistiu em ADN utilizado na mesma concentração que nas condições anteriores, tendo sido atribuída à intensidade de fluorescência desta condição o valor de 100 %. A fluorescência foi medida num fluorímetro SPEX Fluorolog 1681 (SPEX) utilizando um

comprimento de onda de excitação de 518 nm (*slit* 1) e um comprimento de onda de emissão de 605 nm (*slit* 2).

2.2.5. Efeito tampão mediado por PEI

A capacidade tampão de uma solução contendo PEI na concentração de 0,258 mg/mL foi determinada por medição dos valores de pH num aparelho designado pH meter WTW pH537 (WTW), após adição de alíquotas de uma solução de HCl de concentração 12,9 mM. Adicionalmente, avaliou-se o perfil de variação do pH de uma solução contendo PEI na mesma concentração, mas complexado com ADN na razão molar N/P 38 (ADN na concentração de 50 µg/mL), assim como a capacidade tampão de uma solução de glicose a 5 % contendo ou não ADN plasmídico na concentração de 50 µg/mL.

2.2.6. Determinação da eficiência de transfecção mediada por poliplexos

As células HEK-293 (linha celular derivada de células embrionárias de rim humano) foram semeadas em placas de 48 poços com uma densidade de 20000 células por poço (subsecção 2.2.18). Após 24 horas estas foram incubadas com uma solução de glicose a 5 % contendo poliplexos preparados na razão de N/P de 10 ou 38, e com uma quantidade de ADN de 2 µg por poço. Após 4 horas de incubação, as células foram lavadas, tendo o meio de cultura sido substituído por meio novo, e 48 horas depois as células foram analisadas por histoquímica, para detecção da β-galactosidase (subsecção 2.2.22).

2.2.7. Métodos de quantificação de ADN plasmídico em lipopoliplexos

2.2.7.1. Marcação do ADN com ³⁵S dATP

A primeira aproximação de sucesso no que respeita à quantificação de ADN plasmídico complexado com o polímero PEI, consistiu em marcar o ADN com o nucleótido dATP contendo na sua composição o radioisótopo ³⁵S, utilizando o *kit* Random Primed DNA Labeling Kit (Roche Applied Science). Assim, a marcação foi efectuada partindo de uma quantidade inicial de ADN de 3 µg, perfazendo-se o volume

para 9 μL com água destilada estéril. De seguida, as amostras foram sujeitas a incubação a 95 $^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos, para desnaturar o ADN, e colocadas de imediato em gelo. De seguida, e ainda na presença de gelo, adicionou-se um volume de 3 μL da mistura de nucleótidos trifosfato (NTP) (1 μL de dCTP, 1 μL de dTTP e 1 μL de dGTP) e 2 μL da mistura dos hexanucleótidos (*primer*) do referido *kit*, tendo depois sido adicionado o nucleótido marcado [^{35}S] dATP ($\sim 50 \mu\text{ci}$). Finalmente, adicionou-se 1 μL de enzima Klenow, tendo-se sujeito a mistura a incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas, de modo a que a cadeia complementar fosse sintetizada a partir do terminal 3'OH do *primer*. Após esse período, procedeu-se à desactivação da enzima por adição de um volume de 2 μL de solução de EDTA de concentração 0,2 M e pH 8. A purificação do ADN marcado foi efectuada com as colunas Quick Spin incluídas no *kit*, tendo-se procedido à centrifugação das amostras a 1 200 g durante 4 minutos.

Com base neste método, foi possível proceder à quantificação do ADN marcado com o radioisótopo ^{35}S , por adição de líquido de cintilação Universol a cada amostra, procedendo-se à sua análise num contador de cintilações 2000 CA Tri-CARB (Packard).

Foi igualmente possível determinar a eficiência de recuperação do ADN em LPPX após remoção de poliplexos não associados a estes. Essa quantificação foi realizada por medição da radioactividade das diferentes amostras, as quais foram previamente incubadas com líquido de cintilação na diluição de 3/5, após o que se procedeu à quantificação da emissão β (contagens por minuto ou cpm) num contador de cintilações.

2.2.7.2. Marcação do ADN com a sonda Cy3

O ADN plasmídico foi marcado com a sonda Cy3 utilizando o *kit* Label IT (Mirus). Em condições estéreis, diluiu-se 20 μL de uma solução de ADN plasmídico (20 μg) com 155 μL de água estéril destilada, 20 μL do tampão A (10 \times) e finalmente 5 μL do marcador Cy3, ambos pertencentes ao *kit* Mirus Label IT. Após incubação durante 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, ao abrigo da luz, adicionou-se um volume de 550 μL de etanol a 100 % pré-arrefecido, e 22 μL de uma solução de acetato de sódio na concentração de 3 M. Depois de proceder à incubação durante 4 horas à temperatura de -20 $^{\circ}\text{C}$, a amostra foi centrifugada a 20800 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e a amostra lavada com 500 μL de etanol (Sigma) a 70 %, pré-arrefecido, e novamente centrifugada a 20800 g, durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido, deixando-se o excesso de solvente restante evaporar, após o que se procedeu à hidratação do ADN marcado com

água destilada. O plasmídeo marcado foi utilizado na quantificação de ADN complexado com PEI e associado aos lipossomas, tendo-se construído curvas de calibração resultantes de concentrações crescentes de ADN, complexado ou não com o polímero PEI na razão N/P de 10. Adicionalmente, estudou-se a influência da presença de lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL (preparados na razão molar de 3/2/3/2) e DOPE/CHEMS (hemissuccinato de colesteróilo) (preparados na razão (6/4)), na concentração de 0,45 mM, tendo-se igualmente testado a presença de detergente C₁₂E₈ (mono-*n*-dodecil-éter-octaetilenoglicol). Os lipossomas vazios utilizados neste procedimento foram preparados por simples hidratação do filme lipídico seguido de extrusão por membrana com um diâmetro de poro de 200 nm, utilizando um extrusor (Avestin).

O ADN marcado, quando utilizado na preparação de LPPX, foi misturado com ADN não marcado, na percentagem de 5 % do ADN total. As leituras foram efectuadas num fluorímetro SPEX Fluorolog 1681, utilizando um comprimento de onda de excitação de 420 nm e um comprimento de onda de emissão de 549 nm.

2.2.7.3. Quantificação do ADN após dissociação dos poliplexos de PEI/ADN utilizando PMAA

De modo a tornar o ADN acessível ao reagente brometo de etídio ou ao reagente PicoGreen, foi necessário desestabilizar os lipossomas recorrendo ao detergente C₁₂E₈, e numa segunda fase proceder à dissociação do complexo PEI/ADN utilizando ácido polimetacrílico (PMAA). Assim, nas condições que a seguir são referidas, utilizou-se 60 µL do detergente C₁₂E₈ na concentração 20 mM, ou seja, 1,2 µmol por cada 2 µmol de lípido total.

- i. Determinação da concentração mínima de PMAA para dissociar os poliplexos de PEI/ADN

Num primeiro passo procedeu-se à determinação da concentração mínima de PMAA necessária para permitir o acesso completo do brometo de etídio ao ADN, para o que se procedeu à incubação de 0,4 µg de ADN complexado com PEI numa razão N/P de 38 com concentrações crescentes de PMAA (1 a 1250 µM), num volume final de 0,2 mL, durante 60 minutos. Após este período, procedeu-se à adição de 0,8 mL de HBS e 1 mL de uma solução de BrEt de modo a que a sua concentração final fosse de 0,4 µg/mL,

e procedeu-se à leitura da intensidade de fluorescência num fluorímetro SPEX Fluorolog 1681 utilizando um comprimento de onda de excitação de 518 nm (*slit* 1) e um comprimento de onda de emissão de 605 nm (*slit* 2). Como controlo positivo utilizou-se uma solução em tudo idêntica à referida, mas sem PEI.

ii. Curvas padrão de ADN utilizando o reagente BrEt

Após determinação da concentração mínima de PMAA necessária para promover o completo acesso do BrEt ao ADN, construíram-se curvas de calibração de soluções contendo ADN complexado com PEI (N/P 10) na presença de lipossomas compostos por DOPE/CHEMS ou por PI/EPC/DOPE/CHOL de modo a obter uma concentração final de lípido de 0,1 mM (0,2 $\mu\text{mol}/2\text{ mL}$). Assim, a quantidade referida de lípido foi incubada com quantidades crescentes de poliplexos, tendo-se adicionado a quantidade anteriormente referida do detergente C_{12}E_8 , após o que se adicionou um volume fixo de PMAA a todas as amostras, correspondendo à concentração necessária para dissociar a solução de poliplexos de concentração mais elevada utilizada nessa curva. Após perfazer o volume de 0,2 mL, as misturas foram incubadas sob agitação, durante 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, adicionaram-se 0,8 mL de uma solução de HBS, seguindo-se a adição de uma solução contendo o BrEt, de modo a que a concentração final deste fosse 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A eficiência de associação do ADN a lipopoliplexos (EA) compostos por ADN na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ complexado com PEI na razão molar N/P de 20 (R20) e 38 (R38), e por lípidos na concentração de 18,5 mM (preparados pelo método REV-FT) foi determinada com base nos valores de eficiência de recuperação do ADN ($\% R_{\text{ADN}}$) utilizando o reagente brometo de etídio, e com base nos valores de eficiência de recuperação de lípido ($\% R_{\text{L}}$), utilizando o *kit* Infinity (Thermo Electron Corporation) (subsecção 2.2.13).

A eficiência da recuperação do ADN ($\% R_{\text{ADN}}$) foi determinada com base nos valores da sua concentração, a qual foi determinada em duas fases: imediatamente após hidratação do filme lipídico (concentração de ADN = y) e, nas amostras resultantes da eluição em coluna de Sefarose, ou seja, após remoção dos poliplexos não associados aos lipossomas (concentração de ADN = z). Os valores de percentagem de recuperação do ADN foram determinados com base na expressão ($\% R_{\text{ADN}} = z \times 100 / y$).

À semelhança do procedimento utilizado na determinação da eficiência de recuperação do ADN, a determinação da concentração do lípido foi efectuada em duas fases: imediatamente após hidratação do filme lipídico (k), e após remoção dos políplexos não associados aos lipossomas (w), utilizando a expressão ($\% R_L = w \times 100 / k$). A eficiência percentual de associação do ADN aos lipossomas corresponde a $EA = (z / y) \times 100 / (w / k)$.

iii. Curvas padrão de ADN utilizando o reagente PicoGreen

A quantificação do ADN foi efectuada de um modo semelhante ao anteriormente descrito, com a diferença que, após a incubação com PMAA, a incubação subsequente foi efectuada com um volume de 1 mL de uma solução contendo o reagente PicoGreen diluído 200 vezes. A intensidade de fluorescência foi determinada num fluorímetro SPEX Fluorolog 1681, tendo-se utilizado um comprimento de onda de excitação de 480 nm e um comprimento de onda de emissão de 520 nm. Paralelamente, testou-se a influência da presença dos lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL e do detergente $C_{12}E_8$ na curva de calibração. Os resultados obtidos indicaram que na presença de ADN e do reagente PicoGreen, o PMAA, os lipossomas e o $C_{12}E_8$ interferem com os valores de fluorescência observados, indicando que as curvas de calibração preparadas para quantificação do ADN associado aos lipossomas, têm de ser efectuadas na presença de quantidades constantes dos referidos compostos. Assim, as diferentes curvas de calibração foram estabelecidas com concentrações crescentes de ADN, com quantidades crescentes de políplexos preparados na razão N/P de 38, e ainda, com concentrações crescentes de políplexos na presença de lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL, utilizados na concentração de 0,1 mM de lípido total (0,2 $\mu\text{mol}/2$ mL).

A eficiência de associação de ADN a LPPX preparados na concentração em lípido de 9 mM, e na concentração em ADN de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, complexado com PEI na razão molar N/P de 38 (preparados pelo método referido na subsecção 2.2.11.3) foi avaliada com base na recuperação do ADN determinada com o reagente de PicoGreen, e com base na recuperação de colesterol determinado pelo *kit* Infinity (subsecção 2.2.13), à semelhança do procedimento referido na subsecção anterior (ii).

2.2.8. Remoção de ADN plasmídico não associado aos lipossomas

2.2.8.1. Eficiência da coluna de Sefarose CL-4B

Os LPPX foram preparados utilizando os lípidos EPC/DOPE/CHOL na concentração de 18,5 mM e ADN na concentração de 100 µg/mL, complexado com PEI na razão N/P de 10 (LPPX (PEI/ADN R10)), tendo os lipossomas sido marcados com Rh-PE (N-(lissamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina) e o ADN com ³⁵SdATP. Os LPPX preparados de acordo com o procedimento REV-FT descrito na subsecção 2.2.9, foram eluídos em colunas de Sefarose CL-4B, e as fracções de 0,5 mL resultantes foram analisadas num contador de cintilações. Paralelamente, procedeu-se à eluição e análise das fracções de poliplexos de PEI/ADN preparados com ADN na concentração de 100 µg/mL complexado com PEI na razão N/P 10 (PEI/ADN R10). Os resultados foram normalizados em percentagem da quantidade total de ADN eluída.

2.2.8.2. Utilização da coluna de Sefarose CL-4B seguida de ultra-centrifugação

Aquando da aplicação do reagente PMAA para remoção de poliplexos não adsorvidos à superfície dos LPPX (subsecção 2.2.11.3), as colunas de Sefarose passaram a ser eficientes apenas na remoção do complexo PEI/PMAA, sendo que o ADN não encapsulado passou a ser eluído na mesma fracção que os LPPX. Assim, com o objectivo de remover esse ADN e de modo a concentrar os LPPX, passou a efectuar-se um passo de ultra-centrifugação (45000 g, a 4 °C durante 20 minutos, numa centrífuga Beckman TL-100), após eluição na coluna de Sefarose, de modo a formar um *pellet* composto pelos LPPX. O sobrenadante contendo a maioria do plasmídeo livre foi removido e os LPPX cuidadosamente ressuspensos no tampão adequado.

2.2.9. Métodos de preparação de LPPX para determinação da eficiência de recuperação do ADN

Os LPPX foram preparados utilizando ADN na concentração de 100 µg/mL complexado com PEI na razão N/P 38, e lípido nas concentrações iniciais de 18,5 mM e 28 mM. Para cada concentração, testou-se a recuperação do ADN, quer em lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 3/2/3/2 (também identificados

com o símbolo (-)), quer em lipossomas compostos por EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 5/3/2 (também identificados pelo símbolo (0)). Foram testados 4 métodos de preparação de LPPX, designados (A) método de evaporação de fase reversa (REV); (B) hidratação do filme lipídico seguida de congelamento/descongelamento (FT); (C) método de evaporação de fase reversa seguido de congelamento/descongelamento (REV-FT) e (D) hidratação do filme lipídico (hidratação). A eficiência da recuperação do ADN foi determinada com base nos valores de emissão β (cpm) obtidos pelo contador de cintilações (subsecção 2.2.7.1), tendo sido determinado o valor total em cpm das amostras em duas fases: imediatamente após hidratação do filme lipídico (cpm total = y) e nas amostras resultantes da eluição em coluna de Sefarose, ou seja, após remoção dos poliplexos não associados aos lipossomas (cpm total = z). Uma vez que os valores de cpm totais são directamente proporcionais à quantidade de ADN total em cada fase, os valores de percentagem de recuperação do ADN ($\% R_{ADN}$) foram determinados com base na expressão ($\% R_{ADN} = z \times 100 / y$).

Todos os lípidos utilizados foram adquiridos da Avanti Lipids.

2.2.10. Efeito do método REV/FT na integridade e actividade do plasmídeo

2.2.10.1. Efeito do éter na integridade e actividade do plasmídeo

Preparou-se uma solução de ADN plasmídico codificando a proteína β -galactosidase na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução de glicose a 5 %, tendo-se incubado um volume de 0,6 mL com éter dietílico (0,4 mL) e sujeito a evaporador rotativo, utilizando um banho de água a 40 °C, durante 120 minutos. Após esse período, preparou-se uma mistura de 0,2 μg de ADN com 2 μL de *loading buffer* (concentrado 10 vezes) num volume final de 20 μL , procedendo-se à análise por electroforese em gel de agarose, tendo-se efectuado em paralelo, a análise de uma quantidade igual de plasmídeo controlo (plasmídeo não sujeito a estas condições experimentais). Nestas experiências utilizou-se um gel de agarose a 1 % (SeaKem LE agarose, Cambrex) (o tamanho apresentado pelo plasmídeo em estudo é de 7,854 kb). A agarose foi dissolvida em tampão TAE, procedendo-se de seguida à adição de 2 μL de brometo de etídio (10 mg/mL) a 50 mL de gel. Após o gel preparado, as amostras foram aplicadas nos

respectivos poços, tendo-se aplicado uma voltagem constante de 100 V, durante 30 minutos. Finalmente, o gel foi observado no transiluminador VersaDoc modelo 3000 (BioRad), com auxílio de uma câmara para obtenção das imagens.

Adicionalmente, o ADN sujeito à incubação com o éter foi complexado com lipossomas catiónicos (na presença e ausência de transferrina), e de seguida incubado com células HEK-293 (1 µg ADN por poço), previamente semeadas em placas de 48 poços (subsecção 2.2.18). Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo, e após 48 horas as células foram lavadas e lisadas para posterior determinação da quantidade de β-galactosidase (subsecção 2.2.22) e de proteína celular (subsecção 2.2.17).

Procedeu-se igualmente à avaliação da eficiência de transfecção de poliplexos sujeitos à incubação com o éter, em condições idênticas às aplicadas ao plasmídeo.

2.2.10.2. Efeito do método “congelamento/descongelamento” na actividade de transfecção de poliplexos

Preparou-se uma solução de ADN, na concentração de 100 µg/mL, complexado com PEI na razão N/P de 38, em solução de glicose a 5 %, tendo-se sujeito os complexos a sete ciclos de congelamento/descongelamento. Os poliplexos foram de seguida incubados com células HEK-293 (1 µg de ADN por poço), previamente semeadas em placas de 48 poços (subsecção 2.2.18). Como controlo desta condição utilizaram-se poliplexos preparados nas mesmas condições, mas que não foram sujeitos a ciclos de congelamento/descongelamento. O controlo positivo da transfecção consistiu em complexos ternários compostos por DOTAP/CHOL, ADN e transferrina. Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo e após 48 horas as células foram lavadas e lisadas para posterior determinação da quantidade de β-galactosidase produzida (subsecção 2.2.22) e da proteína celular (subsecção 2.2.17).

2.2.11. Preparação de LPPX direccionados para avaliação da interacção celular

2.2.11.1. Procedimento A

O filme lipídico composto por PI/EPC/DOPE/CHOL, na razão molar de 3/2/3/2 foi obtido tendo-se utilizado diferentes percentagens do conjugado reactivo DSPE-PEG-

Mal (1,5 %, 3,5 % e 5 %), e uma quantidade de DSPE-PEG variável de modo a que a percentagem final da molécula de PEG fosse 5 % do lípido total. Os filmes lipídicos obtidos pela evaporação do clorofórmio da mistura lipídica foram dissolvidos num volume de 0,4 mL de éter dietílico. De seguida, adicionou-se a solução de poliplexos (0,35 mL) preparados na concentração de 100 µg de ADN/mL, complexado com PEI na razão molar N/P referida, procedendo-se à evaporação do éter num evaporador rotativo sob vácuo, mantendo a mistura a 40 °C por imersão em banho de água. Após formação da fase de gel, a amostra foi retirada e sujeita a agitação em vórtex, tendo-se de seguida adicionado o restante volume da amostra de poliplexos (0,15 mL) de modo a obter uma concentração final de lípido total de 18,5 mM. Finalmente, procedeu-se à remoção de resíduos de éter no evaporador rotativo por mais 2 horas. Após esse período, sujeitou-se a amostra a 7 ciclos de congelamento/descongelamento utilizando para tal uma mistura de gelo seco/etanol, e um banho de água a 40 °C. De seguida, procedeu-se à extrusão dos referidos LPPX através de membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm, e seguidamente à eluição destes através de uma coluna de Sefarose CL-4B, previamente eluída com um tampão de HBS contendo Hepes na concentração de 50 mM e cloreto de sódio na concentração adequada para obter a mesma osmolalidade que a solução de poliplexos a associar aos lipossomas. Utilizou-se ainda EDTA (Sigma) na concentração de 2 mM e aferiu-se o valor de pH a 7,2.

Paralelamente a este processo, efectuou-se a activação da transferrina (43 mg Tf por mg de colesterol) por incubação com 2-iminotiolano, durante 40 minutos à temperatura ambiente, tendo-se utilizado uma razão de 1 mol de transferrina por 5 mol de 2-iminotiolano, numa solução de HBS contendo EDTA, na concentração de 2 mM e a pH 8. Após este período de activação, procedeu-se à remoção do 2-iminotiolano em coluna de Sefadex G-25, por centrifugação a 500 g, durante 5 minutos e a 4 °C. A transferrina activada foi incubada com os LPPX eluídos da coluna, durante 12 horas, à temperatura ambiente e sempre que possível, as incubações foram efectuadas ao abrigo da luz e em atmosfera de azoto. Após esse período, os LPPX foram incubados com β-mercaptoetanol (5 mol de β-mercaptoetanol por mol de grupos maleimida) durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, o excesso de transferrina não acoplada aos LPPX, assim como o β-mercaptoetanol foram removidos por eluição através da coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com tampão HBS a pH 7,4.

2.2.11.2. Procedimento B

Relativamente ao procedimento A, salientam-se as alterações no método de preparação (FT), nas concentrações lipídicas e do ADN, assim como a introdução do polímero PEG por conjugação a LLPX pré-formados.

O filme lipídico composto por PI/EPC/DOPE/CHOL (3/2/3/2) obtido por evaporação do clorofórmio da mistura lipídica, foi hidratado com a solução de poliplexos (0,5 mL), preparados na concentração de 50 µg de ADN/mL, complexado com PEI na razão molar N/P referida, tendo-se obtido uma concentração em lípido total de 9 mM. Nos estudos de associação celular utilizou-se Rh-PE na percentagem de 1 % da quantidade total de lípido. A amostra foi sujeita a 7 ciclos de congelamento/descongelamento, utilizando-se para tal uma mistura de gelo seco/etanol, e um banho de água a 40 °C, após o que se procedeu à extrusão dos referidos LPPX através de membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm. De seguida, os LPPX foram eluídos através de uma coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com um tampão de HBS contendo EDTA (Sigma) na concentração de 2 mM, a pH 7,4.

Após incubação dos LPPX com NHS-PEG-Mal, na razão de 5 mg de NHS-PEG-Mal/mg de colesterol durante 2 horas, à temperatura ambiente, procedeu-se à remoção do NHS-PEG-Mal não acoplado por eluição através de coluna de Sefarose equilibrada com um tampão de HBS contendo EDTA (Sigma) na concentração de 2 mM, a pH 7,2.

A incubação com o ligando transferrina, assim como todos os passos subsequentes foram efectuados de acordo com o descrito na subsecção anterior (2.2.11.1).

i. Detecção de grupos maleimida à superfície de LPPX-PEG-Mal

Procedeu-se a uma estimativa da quantidade de NHS-PEG-Mal mais adequada para incubar com os LPPX, de acordo com dados existentes na literatura.

Com o objectivo de determinar a disponibilidade de grupos Mal à superfície dos LPPX, adicionaram-se quantidades crescentes de glutathiona reduzida (GSH) a LPPX, previamente incubados com NHS-PEG-Mal (5 mg de PEG por mg de colesterol), durante 2 horas à temperatura ambiente. Paralelamente, procedeu-se à incubação de iguais quantidades de GSH com LPPX sem PEG, e seguidamente das amostras com o composto DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)), o qual permite a quantificação de grupos tiol da glutathiona reduzida. Após 2 horas, procedeu-se à leitura dos valores de

absorvância das diferentes amostras ao comprimento de onda de 412 nm, num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS (Perkin Elmer).

ii. Comparação dos perfis de eluição de LPPX e NHS-PEG-Mal: separação do PEG não acoplado

O perfil de eluição de uma solução de NHS-PEG-Mal (3,5 mg/mL) foi determinado após eluição de um volume de 0,5 mL em coluna de Sefarose CL-4B, por medição da absorvância das fracções recolhidas, a 240 nm, num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS. A percentagem de PEG em cada fracção foi determinada em função da quantidade total de PEG recolhida. Os LPPX, foram preparados com uma concentração de ADN de 100 µg/mL complexado com PEI numa razão N/P 38, e com uma concentração de lípido de 18,5 mM contendo Rh-PE na percentagem de 1 %. De seguida, foram eluídos, e o seu perfil de eluição foi avaliado por medição da fluorescência e comparado com o perfil de eluição do conjugado NHS-PEG-Mal.

2.2.11.3. Procedimento C

Relativamente ao procedimento B, salienta-se a introdução da incubação com PMAA, com o intuito de remover PEI adsorvido à superfície dos LPPX.

Os LPPX foram preparados conforme descrito na subsecção anterior (2.2.11.2), até à fase de extrusão. Nos estudos de associação celular utilizou-se Rh-PE na percentagem de 1 % da quantidade total de lípido. Após incubação dos LPPX com PMAA de modo a remover PEI adsorvido, procedeu-se à sua eluição através de uma coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com um tampão de HBS contendo EDTA (Sigma) na concentração de 2 mM, a pH 7,4 e de seguida a ultracentrifugação a 45000 g, durante 20 minutos, a 4 °C, para concentração da amostra e remoção do ADN plasmídico.

De seguida, os LPPX foram incubados com NHS-PEG-Mal, na razão de 5 mg de NHS-PEG-Mal por mg de colesterol, durante 2 horas, à temperatura ambiente, após o que se procedeu à remoção do PEG não acoplado por eluição através de coluna de Sefarose, equilibrada com um tampão de HBS contendo EDTA (Sigma) na concentração de 2 mM, a pH 7,2.

Paralelamente a este processo, efectuou-se a activação da transferrina, tendo-se testado o efeito de diferentes quantidades de ligando (21,5, 43 e 86 mg de Tf por mg de

colesterol) por incubação com 2-iminotiolano, durante 40 minutos à temperatura ambiente, e usando uma razão de 1 mol de transferrina por 5 mol de 2-iminotiolano, numa solução de HBS contendo EDTA na concentração de 2 mM e pH 8. Após este período de activação, procedeu-se à remoção do 2-iminotiolano em coluna de Sefadex G-25, por centrifugação a 500 g, durante 5 minutos, a 4 °C. A transferrina activada foi incubada com os LPPX eluídos da coluna, durante 12 horas, à temperatura ambiente, e sempre que possível as incubações foram efectuadas ao abrigo da luz e em atmosfera de azoto. Após esse período, os LPPX foram incubados com β -mercaptoetanol (5 mol de β -mercaptoetanol por mol de grupos Mal) durante 30 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, o excesso de transferrina não acoplada aos LPPX, assim como o β -mercaptoetanol, foram removidos por eluição através da coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com tampão HBS de pH 7.

i. Efeito do PMAA na dissociação de políplexos de PEI/ADN

Os políplexos de PEI/ADN foram preparados na razão molar N/P de 38, e na concentração de ADN de 100 μ g/mL, tendo-se incubado uma alíquota destes com PMAA durante 60 minutos. Após esse período, procedeu-se à eluição da mistura através de uma coluna de Sefarose CL-4B, e as fracções resultantes foram incubadas directamente com o reagente PicoGreen e analisadas por fluorimetria. Em paralelo, procedeu-se à eluição de uma solução de ADN na mesma concentração que a condição anterior, procedendo-se de igual modo à incubação directa das fracções eluídas com o reagente PicoGreen e respectiva quantificação.

2.2.12. Preparação de lipossomas vazios conjugados com NHS-PEG-Mal para estudos de associação celular

A preparação dos lipossomas foi efectuada por hidratação de um filme lipídico composto por PI/EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 3/2/3/2, com uma solução de glucose a 5 %. Após extrusão através de membranas com poros de diâmetro de 200 nm, procedeu-se à incubação do NHS-PEG-Mal com os lipossomas na razão de 5 mg por mg de colesterol. As moléculas de PEG não acopladas foram removidas através de uma coluna de Sefarose CL-4B, e os lipossomas foram seguidamente incubados com transferrina activada (21,5, 43 e 86 mg de Tf por mg de colesterol). Finalmente, os

grupos maleimida foram desactivados com β -mercaptoetanol, e a transferrina não acoplada foi removida utilizando uma coluna de Sefarose CL-4B.

2.2.13. Quantificação do colesterol

A quantificação do colesterol foi efectuada com o *kit* Infinity (Thermo Electron Corporation), de acordo com as instruções do fornecedor. O reagente de quantificação possui na sua composição a enzima colesterol oxidase, a qual, na presença de oxigénio, converte o colesterol a colesteno e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio, na presença do ácido hidroxibenzoico e da 4-aminoantipirina, origina a formação do corante quinoneimina que apresenta uma máximo de absorvância ao comprimento de onda de 500 nm. Assim, após adição de 20 μ L de cada amostra ou de cada padrão a 1 mL de reagente, seguida da incubação durante 5 minutos, a 37 °C, procedeu-se à leitura dos valores da absorvância a um comprimento de onda de 500 nm, num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS.

2.2.14. Quantificação da transferrina

A quantificação da transferrina foi efectuada utilizando o reagente ácido bicinconínico (BCA). Este método baseia-se na redução do Cu^{2+} a Cu^+ pelas proteínas, o qual por sua vez complexa com o BCA, originando um composto azul púrpura. A curva padrão foi construída a partir de uma solução *stock* da proteína BSA (albumina sérica de bovino), tendo-se utilizado o mesmo tampão em que se encontravam as amostras (5 a 40 μ g de proteína/mL). As amostras e os padrões (volume máximo de 50 μ L) foram incubadas com um volume de 0,2 mL de uma mistura da solução contendo Cu^{2+} com o reagente BCA (3 μ L da solução contendo cobre para 50 μ L da solução de BCA). As amostras foram sujeitas a aquecimento a uma temperatura de 65 °C durante 30 minutos, após o que se procedeu à leitura dos valores da absorvância a 570 nm, num leitor ELISA (Thermo Electron Corporation). Nas situações em que existem substâncias interferentes, tal como no caso dos LPPX em que o polímero PEI interfere na quantificação da transferrina, a curva de calibração foi construída na presença de quantidades constantes de LPPX (sem Tf), tendo-se determinado a quantidade de transferrina num volume de amostra equivalente à quantidade de lípido utilizada na obtenção da curva de calibração. A eficiência de acoplamento foi determinada com base

na concentração do ligando e de lípido na solução final dos LPPX direccionados, sendo este parâmetro expresso em mol de transferrina por mol de lípido.

2.2.15. Efeito da razão 2-iminotiolano/transferrina na sua eficiência de activação

A transferrina foi incubada com 2-iminotiolano durante 40 minutos à temperatura ambiente, tendo-se testado as razões molares de 5, 10 e 20 mol de 2-iminotiolano por mol de transferrina. O processo de activação do ligando decorreu em solução de HBS contendo EDTA, na concentração de 2 mM e a pH 8. De seguida, a transferrina foi purificada utilizando uma coluna de Sefadex G25, procedendo-se a uma centrifugação a 500 g, durante 5 minutos, a 4 °C. A quantidade de grupos tiol adicionados à transferrina foi determinada com o reagente DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)), recorrendo a uma curva de calibração construída com diferentes concentrações do padrão GSH. As leituras foram efectuadas num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS.

2.2.16. Remoção da transferrina não acoplada

A transferrina não acoplada deve ser removida dos lipossomas direccionados de modo a evitar a competição entre esta e a transferrina conjugada, para o respectivo receptor. De modo a avaliar a eficiência da coluna de Sefarose CL-4B neste contexto, procedeu-se à eluição de uma solução de transferrina com a concentração de 24 mg/mL, sendo que as fracções de 0,5 mL resultantes foram analisadas por espectroscopia, utilizando um comprimento de onda de 280 nm. Os valores de absorvância determinados foram normalizados para 100 % em função da quantidade total de proteína eluída. A Sefarose CL-4B demonstrou ser uma boa estratégia para este efeito, uma vez que, tal como demonstrado na Figura 2.2, permite a eluição do ligando em fracções posteriores às da eluição dos LPPX.

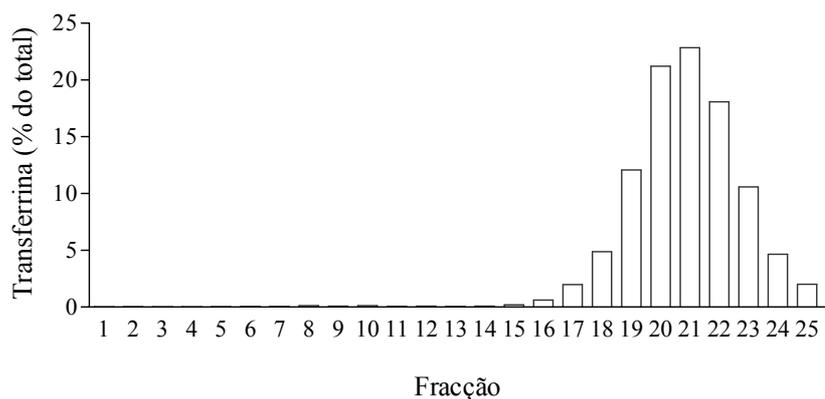


Figura 2.2- Separação da transferrina em coluna de Sefarose

Uma solução contendo transferrina na concentração de 24 mg/mL foi previamente incubada com 2-iminotiolano, após o que foi eluída através de uma coluna de Sefarose CL-4B. As frações de 0,5 mL resultantes foram analisadas por espectroscopia utilizando um comprimento de onda de 280 nm, sendo que os valores resultantes foram normalizados para 100 % em função da quantidade total de proteína eluída.

2.2.17. Quantificação da proteína celular

A proteína celular foi quantificada pelo método Sedmack, tendo-se utilizado para tal curvas de calibração elaboradas com a proteína BSA. Os resultados foram utilizados para normalização dos valores da expressão da β -galactosidase, sempre que referido.

2.2.18. Cultura celular

As células HEK-293 (células embrionárias de rim humano) foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma) com glucose na concentração de 4500 mg/L e L-glutamina, tendo-se suplementando este meio com soro fetal de bovino a 10 %, estreptomicina na concentração de 100 μ g/mL, penicilina na concentração de 100 unidades/mL e bicarbonato de sódio na concentração de 1,5 g/L.

2.2.19. Determinação da expressão da transferrina

As células HEK-293 foram destacadas com tripsina e imediatamente diluídas e ressuspensas em PBS (tampão fosfato salino) contendo soro fetal de bovino a 20 %. Após centrifugação e remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em PBS, tendo-lhes sido adicionado 15 μ l de transferrina conjugada com Alexa Fluor (Molecular Probes). Após 30 minutos de incubação a 4 °C, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo.

2.2.20. Associação celular

2.2.20.1. Microscopia de fluorescência e confocal (LP e LPPX)

Os lipossomas marcados com Rh-PE (1 % do lípido total), cuja preparação se encontra descrita na subsecção 2.2.12, foram incubados com células HEK-293 na concentração de 300 μ M em lípido, durante 4 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e fixadas com PFA (paraformaldeído, Sigma) a 4 % durante 15 minutos. As amostras foram lavadas e preparadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories) e, finalmente, analisadas por microscopia de fluorescência, num microscópio Axioskop 2 Plus (Zeiss). Foram testados (1) lipossomas sem PEG nem transferrina; (2) lipossomas com PEG e sem transferrina; (3), (4) e (5)-lipossomas com PEG e incubados com transferrina em quantidades crescentes: 22, 44 e 87 mg, respectivamente.

Os LPPX contendo poliplexos na razão N/P de 38, marcados com Rh-PE (1 % do lípido total), foram preparados de acordo com o procedimento descrito nas secções 2.2.11.2 e 2.2.11.3, e incubados com células HEK-293 na concentração de 300 μ M, durante 4 horas. Após esse período, as células previamente semeadas em lâminas de 8 poços, foram lavadas com PBS, fixadas com PFA a 4 % durante 15 minutos e posteriormente incubadas com solução de glicina na concentração de 0,1 M. As amostras foram lavadas e preparadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI, e finalmente analisadas por microscopia confocal, num microscópio confocal LSM510 (Zeiss). Estudos paralelos foram efectuados com LPPX contendo poliplexos preparados na razão molar N/P de 10.

2.2.20.2. Citometria de fluxo (LP)

Os lipossomas vazios (não associados a poliplexos) compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 3/2/3/2 e marcados com Fluor-PE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carboxifluoresceína)) (4 % de lípido total) foram preparados conforme descrito na subsecção 2.2.12 e incubados com células HEK-293, na concentração de 80 e 160 μ M, durante 4 horas. Após esse período, as células previamente semeadas em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS e destacadas com tripsina, procedendo-se então à sua diluição e ressuspensão com solução de PBS contendo FBS (soro fetal de bovino) a 20 %. De seguida, as células foram novamente

lavadas com PBS e ressuspensas no mesmo meio, e analisadas por citometria de fluxo. A condição designada controlo corresponde a células que não foram incubadas com lipossomas, a condição “LP-Peg” corresponde a células incubadas com lipossomas contendo PEG, mas sem o ligando transferrina, enquanto que a condição “LP-Tf” corresponde a lipossomas conjugados com PEG e com o ligando transferrina. Nestas duas últimas condições testou-se adicionalmente o efeito da presença de transferrina livre (20 µg/mL), na eficiência de associação celular.

2.2.21. Transfecção mediada por LPPX direccionados

Os LPPX dos tipos A, B e C (subsecções 2.2.12.1, 2.2.12.2 e 2.2.12.3) foram incubados com as células HEK-293, na concentração de 300 µM, previamente semeadas em placas de 48 poços (20000 células por poço). Paralelamente, procedeu-se ainda à incubação com as células HEK-293 de complexos ternários compostos por DOTAP (cloreto de 1,2- dioleoil-3 propanoato de trimetilamónio)/CHOL/Tf/ADN. Os lipossomas de DOTAP/CHOL foram preparados na razão molar de 1/1, seguindo-se a adição de 3,5 µg Tf por nmol de lípido total, e de ADN de modo a obter a razão de carga de 3/2 (+/-), tendo sido utilizado 1 µg de ADN por poço. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído, e 48 horas depois as células foram lavadas e lisadas para análise da expressão da β-galactosidase. Os resultados finais de transfecção obtidos com LPPX do tipo C encontram-se apresentados em função dos valores correspondentes à condição dos complexos ternários, à qual se atribuiu o valor de 100 %.

2.2.22. Detecção e quantificação da β-galactosidase

A análise histoquímica da expressão da β-galactosidase foi efectuada após fixação das células com uma solução de PFA a 4 %, durante 20 minutos, a 4 °C. Após lavagem, as células foram incubadas com a solução corante, a qual foi preparada por adição dos seguintes volumes dos diferentes compostos: 62,5 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indoil β-D-galactopiranosse (X-Gal) (40 mg/mL, em dimetilformamida), 100 µL de ferricianeto de potássio (41 mg/mL), 100 µL de ferrocianeto de potássio (53 mg/mL), 2,5 µL de cloreto de magnésio (2 M) e 2,235 mL de PBS, tendo todos estes compostos sido adquiridos da Sigma. A incubação com as células, efectuada a 37 °C, decorreu até desenvolvimento da cor azul para observação ao microscópio, tendo as células sido

seguidamente lavadas e observadas por microscopia (Leica DMIL), utilizando uma objectiva com ampliação de 20×.

Para quantificar a β -galactosidase expressa pelas células, estas foram lisadas com tampão de lise (Triton-X 100 (éter p-t-octilfenil polioxietileno) (Sigma) a 0,1 % (m/v) e Tris-Base (Sigma) na concentração de 0,25 M, a pH 8), após o que foram congeladas a -80 °C, de modo a auxiliar a lise celular. As células foram de seguida sujeitas a centrifugação a 20800 g, durante 20 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para quantificação da β -galactosidase. Para tal, as amostras foram diluídas com PBS (20 μ L de amostra e 30 μ L de PBS) e incubadas com um volume de 150 μ L da solução de ONGP (nitrofenil galactopiranosido) (Sigma) na concentração de 1,5 mg/mL, a qual foi preparada por dissolução do referido composto numa solução contendo fosfato de sódio dibásico (Sigma) na concentração de 60 mM, cloreto de magnésio (Sigma) na concentração de 1 mM, cloreto de potássio (Sigma) na concentração de 10 mM e β -mercaptoetanol (Sigma) na concentração de 50 mM, a pH 8. As soluções padrão foram preparadas com β -galactosidase de *E. coli* (Sigma), tendo-se adicionado a cada alíquota de 10 μ L do padrão β -galactosidase (correspondendo a diversas concentrações), 20 μ L de tampão de lise, 20 μ L de PBS e 150 μ L de solução ONGP. Após 45 minutos de incubação a 37 °C, procedeu-se à determinação da absorvância num leitor ELISA (Thermo Electron Corporation) a 405 nm.

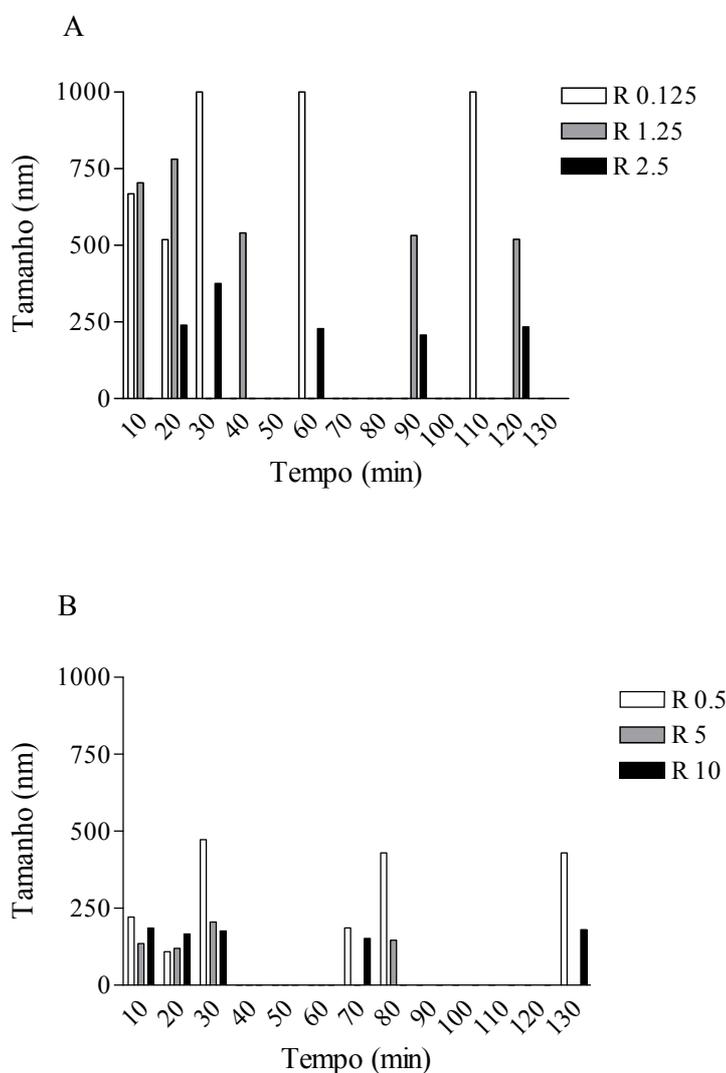
2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Caracterização de poliplexos compostos por PEI/ADN

2.3.1.1. Tamanho dos poliplexos

De modo a determinar as condições óptimas de preparação de poliplexos, foram identificados vários factores que podem influenciar o seu tamanho. Um desses factores é a razão molar amina/fosfato (N/P), em que os grupos amina são provenientes da polietilenimina, e os grupos fosfato são provenientes do ADN. Para cada concentração de ADN testada, a utilização de razões N/P baixas induz a formação de poliplexos cujo tamanho médio é elevado ou aumenta ao longo do tempo (Figura 2.3). Inversamente, o aumento da razão N/P tende a gerar partículas de tamanho inferior, o qual se mantém

estável ao longo do tempo. Deste modo, para a concentração mais elevada de ADN testada (100 $\mu\text{g/mL}$), as partículas apresentaram um tamanho médio de 700 nm (N/P 0,125 e 1,25) (Figura 2.3 A), o qual tende a aumentar com o tempo, atingindo tamanhos da ordem dos 2000 nm (resultados não apresentados). Contudo, aumentando a razão N/P para 2,5, o tamanho das partículas diminuiu para valores entre 250 a 350 nm, o qual se mantém constante até 3 horas após a preparação. Esta variação do tamanho em função da razão N/P foi previamente observada por Kunath e colaboradores¹² para PEI de baixo peso molecular. Goula e colaboradores²⁸ reportaram que o aumento da razão N/P de 2 para 10 reduziu o tamanho das partículas de 100 para 50 a 60 nm.



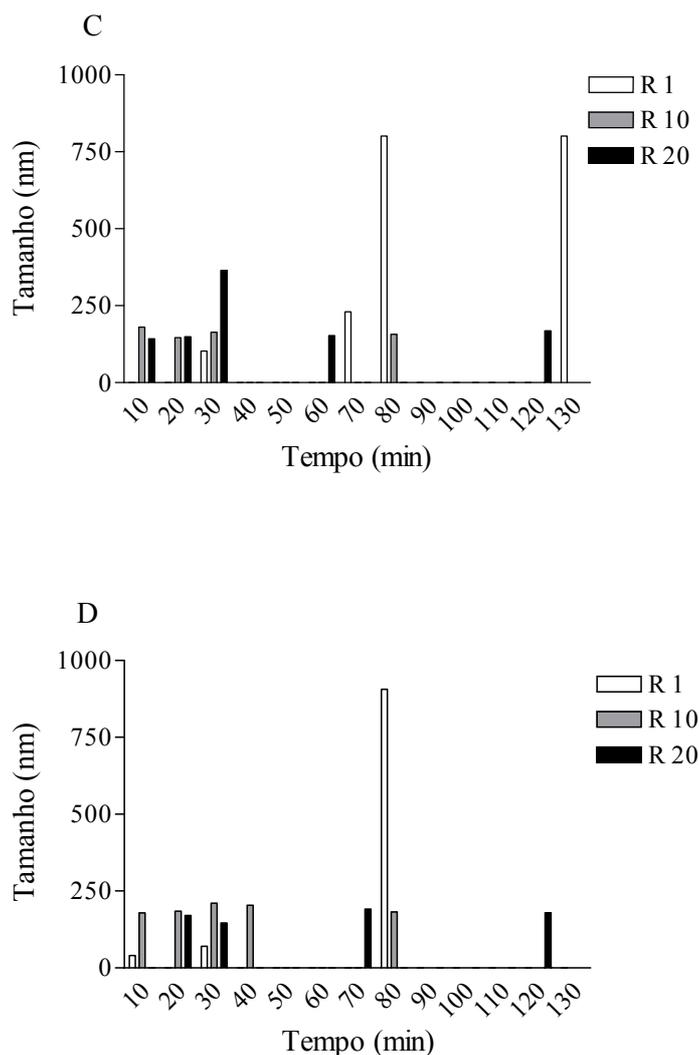


Figura 2.3- Variação do tamanho dos políplexos de PEI/ADN em função do tempo após preparação, da concentração do ADN e da razão molar R amina/fosfato (N/P)

As concentrações de ADN utilizadas foram (A) 100 µg/ mL, (B) 50 µg/ mL, (C) 25 µg/ mL e (D) 12,5 µg/ mL. Os políplexos foram preparados numa solução de glicose a 5 %, por adição da solução contendo ADN a igual volume da solução contendo PEI. Dez minutos após a mistura, procedeu-se à primeira determinação do tamanho dos políplexos resultantes, tendo-se posteriormente efectuado diversas determinações para diferentes tempos de incubação (realizada à temperatura ambiente). A determinação de tamanhos foi realizada por espectroscopia de correlação fotónica.

Para as restantes concentrações de ADN testadas, o padrão de variação do tamanho é mantido (Figura 2.3 B, C e D). Assim, para razões N/P mais baixas, existe uma tendência para que o tamanho dos políplexos aumente com o tempo de incubação, sendo que para valores de razão N/P superiores se verifica uma diminuição significativa do seu tamanho, assim como a manutenção deste parâmetro ao longo do tempo. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriormente reportados com outros sistemas

catiônicos, segundo os quais a utilização de um excesso de cargas positivas em complexos formados a partir de lipossomas catiônicos e ADN, poderá ser responsável pela existência de forças electrostáticas repulsivas entre os complexos, impedindo deste modo a agregação e promovendo a estabilidade coloidal²⁹.

É ainda possível observar que para razões N/P mais baixas, o tamanho inicial dos poliplexos aumenta com a utilização de concentrações de ADN mais elevadas. Assim, os poliplexos preparados com razões N/P próximas de 1 e uma concentração de ADN de 100 µg/mL apresentam um tamanho médio de 750 nm (Figura 2.3 A), enquanto que o tamanho de poliplexos preparados na mesma razão N/P e ADN numa concentração de 25 µg/mL e 12 µg/mL apresentam tamanhos médios de 102 nm e 70 nm, respectivamente (Figura 2.3 C e D). Este efeito poderá decorrer como consequência de uma menor separação inter-partículas³⁰.

A par da razão N/P e da concentração de ADN, a força iónica da solução utilizada durante a complexação também constitui um factor determinante para o tamanho final dos poliplexos. Por esta razão, a sua preparação foi efectuada numa solução de glicose a 5 %, uma vez que as soluções salinas induziram frequentemente precipitação dos poliplexos. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por Kircheis e colaboradores³¹, segundo o qual, a utilização de soluções com baixa força iónica na preparação de poliplexos induz normalmente a formação de partículas de tamanho inferior ao obtido aquando da utilização de soluções com forças iónicas superiores. Uma possível justificação para este facto poderá ter como base a atenuação de interacções electrostáticas mediada pelo aumento da força iónica. Neste caso específico, em que se utilizou um excesso de cargas positivas, a atenuação das forças electrostáticas repulsivas que ocorreu na presença de forças iónicas mais elevadas, terá sido responsável pela formação de agregados.

Conforme sugerido por Pedroso de Lima e colaboradores³² são vários os factores que influenciam a carga de superfície dos complexos, nomeadamente o seu modo de preparação, e que como tal influenciam a estabilidade coloidal dos complexos. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a preparação dos poliplexos deve ser efectuada em solução de glicose a 5 %, e com razões N/P elevadas para manter o tamanho reduzido e estável ao longo do tempo, mesmo para concentrações de ADN mais elevadas.

2.3.1.2. Protecção do ADN com base no teste da acessibilidade do brometo de etídio

O grau de protecção conferido ao ADN, pela condensação com o PEI, foi avaliado com base no teste da acessibilidade do brometo de etídio, conforme descrito na secção “Materiais e métodos” deste capítulo. Os resultados obtidos mostram que, para uma razão N/P de 38, o ADN se encontra completamente inacessível ao brometo de etídio (Figura 2.4), o que sugere uma eficiente protecção contra a acessibilidade de moléculas maiores tais como ADNases. Como controlo, utilizou-se ADN complexado com PEI e posteriormente incubado com PMAA, um composto que apresenta capacidade de dissociar os poliplexos de PEI/ADN, indicando que a presença do polímero PEI, por si só, não interfere com a fluorescência mediada pelo brometo de etídio.

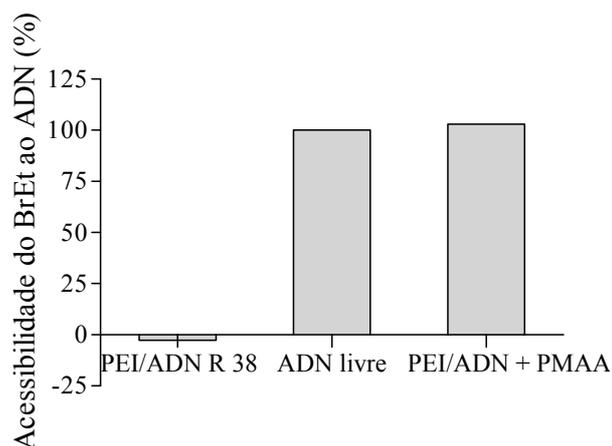


Figura 2.4- Acessibilidade do brometo de etídio ao ADN complexado com PEI

O ADN plasmídico foi complexado com PEI numa razão molar N/P de 38 de modo a obter uma concentração de 100 µg/mL. Uma alíquota desta solução foi incubada com uma solução contendo brometo de etídio de modo a obter uma concentração final deste composto de 0,4 µg/mL. A solução controlo consistiu em ADN incubado com brometo de etídio nas mesmas condições, tendo sido atribuída à fluorescência desta solução o valor de 100 %. Paralelamente, testou-se o efeito do reagente PMAA na dissociação de complexos de PEI/ADN preparados nas mesmas condições. A fluorescência foi quantificada tal como descrito na secção de “Materiais e métodos”.

Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, onde se demonstra que as moléculas de PEI de baixo peso molecular conseguem proteger o ADN do acesso

ao brometo de etídio mesmo para baixas razões N/P (N/P 4). Contudo, para razões inferiores a 4, as moléculas de PEI de peso molecular superior apresentam melhor capacidade de proteger o ADN do que as moléculas de PEI de baixo peso molecular¹².

2.3.1.3. Efeito tampão mediado por PEI

De modo a determinar se o polímero PEI utilizado neste trabalho apresenta a capacidade tampão reconhecida para moléculas de PEI de elevado peso molecular, foram efectuadas adições sucessivas de uma solução de HCl a soluções de PEI, quer livre, quer associado ao ADN (N/P 38), de modo a que a concentração final de HCl incubada com o polímero fosse aumentando após cada adição.

Os resultados ilustrados na Figura 2.5 demonstram que o polímero PEI com peso molecular de 2,7 kDa enquanto livre, ou complexado com o ADN, apresenta capacidade tampão, ao contrário do observado com as soluções controlo, preparadas por adição de ADN a uma solução de glucose a 5 %, ou consistindo apenas numa solução de glicose a 5 %, nas quais a diminuição do pH corresponde à quantidade de protões adicionada.

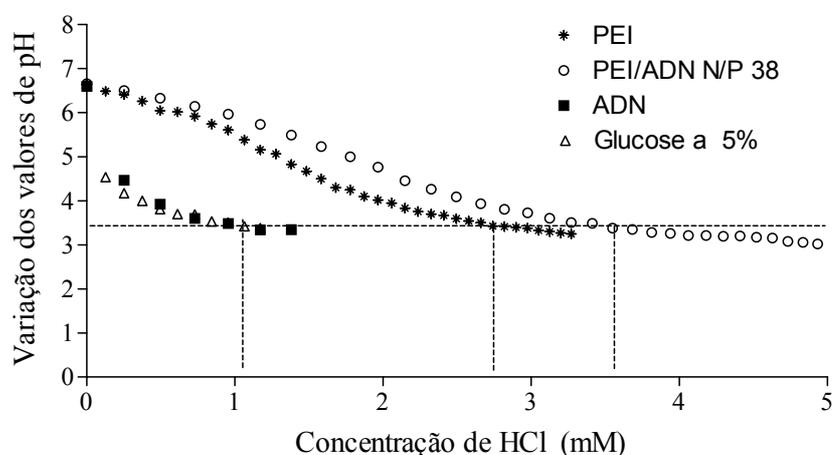


Figura 2.5- Efeito tampão mediado por PEI

A capacidade tampão de uma solução contendo PEI foi medida por adição sucessiva de HCl, simultaneamente com o registo dos valores de pH. Adicionalmente, avaliou-se o perfil de variação do pH numa solução contendo políplexos preparados na razão N/P 38 e ADN na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tendo-se procedido de igual modo na avaliação da capacidade tampão de soluções controlo, consistindo em glucose a 5 % contendo ou não ADN plasmídico na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As medições foram efectuadas após adições sucessivas de alíquotas da solução de HCl.

A capacidade tampão máxima do polímero varia entre os valores de pH 7 e 3,5, intervalo que corresponde à janela de interesse para permitir a libertação do ADN a partir do endossoma.

2.3.1.4. Eficiência de transfecção mediada por poliplexos em função da razão N/P

No que diz respeito ao efeito do peso molecular do polímero na eficiência de transfecção, os resultados reportados na literatura são contraditórios. Enquanto Godbey e colaboradores observaram um aumento de transfecção com o aumento do peso molecular (70 kDa > 10 kDa > 1,8 kDa) *in vitro*³³, Abdallah e colaboradores observaram uma diminuição da eficiência de transfecção com o aumento do peso molecular (25 kDa > 50 kDa > 800 kDa) *in vivo*³⁴. Já foi previamente demonstrado por outros autores que as moléculas de PEI de baixo peso molecular como o PEI de 5 kDa, também podem apresentar elevada eficiência de transfecção *in vitro*, o que se deve provavelmente à sua baixa toxicidade, permitindo razões N/P bastante mais elevadas (por exemplo, N/P 67) do que as utilizadas com PEIs de peso molecular superior, e portanto apresentando um efeito de esponja de prótons mais eficiente¹². Os resultados ilustrados na Figura 2.6 demonstram que a polietilenimina utilizada neste trabalho (2,7 kDa) também é um reagente de transfecção eficiente. Os poliplexos preparados em razões N/P elevados (N/P 38) apresentam eficiências de transfecção superiores à dos poliplexos preparados em razões mais baixas (N/P 10), sem que se tivessem verificado alterações morfológicas visíveis indicativas de toxicidade celular. Os resultados obtidos demonstram que o polímero PEI, quando utilizado em elevadas razões N/P, pode induzir elevados níveis de transfecção.

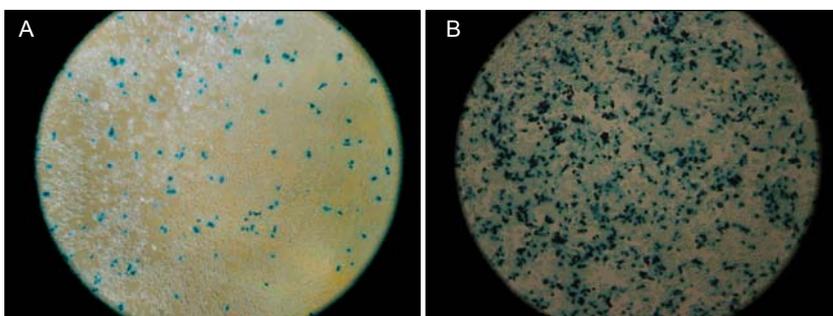


Figura 2.6- Eficiência de transfecção mediada por poliplexos

Os poliplexos foram preparados numa solução de glucose a 5 %, e após 15 minutos foram incubados com células HEK-293, previamente semeadas em placas de 48 poços. A cada poço adicionou-se um volume de poliplexos equivalente a 2 µg de ADN, preparados nas razões

molares N/P de 10 (A) ou 38 (B). Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio novo, e após 48 horas as células foram sujeitas a análise histoquímica para detecção da expressão da β -galactosidase e, finalmente, observadas com objectiva de ampliação de 20 \times .

Apesar de se encontrar descrito que para razões N/P de 4 já se verifica condensação completa do ADN¹², os resultados sugerem que um excesso de PEI pode ser útil na promoção da transfecção mediada por este polímero. Este efeito poderá ser consequência do aumento da capacidade tampão, e consequentemente de uma maior eficácia em promover a libertação dos poliplexos e/ou do ADN do endossoma para o citoplasma, permitindo que um número maior de plasmídeos atinja o núcleo.

Devido aos elevados níveis de transfecção, obtidos com os poliplexos preparados na razão N/P 38, estes foram seleccionados para iniciar os estudos de associação do ADN aos lipossomas.

2.3.2. Encapsulação de poliplexos compostos por PEI/ADN em lipossomas

Após caracterização dos poliplexos preparados a partir de ADN plasmídico e PEI, procedeu-se à associação destes a lipossomas. Contudo, de modo a ser possível avaliar a eficácia deste processo, foi necessário desenvolver métodos que permitissem a quantificação de ADN na presença de PEI e de lípidos, para posteriormente proceder à optimização dos processos de preparação dos lipopoliplexos resultantes.

2.3.2.1. Métodos de quantificação de ADN plasmídico em LPPX

A forte interacção entre o polímero PEI e a molécula de ADN constitui a principal razão pela qual este polímero é tão eficiente no processo de condensação do material genético. Contudo, esta associação do PEI ao ADN dificulta a posterior quantificação do ácido nucleico após a preparação do poliplexo. De modo a que o ADN ficasse disponível para a sua quantificação, tentou-se promover a dissociação dos poliplexos com detergentes, tais como o C₁₂E₈ ou o Triton X-100, sem que no entanto tais estratégias se mostrassem eficientes.

i. Marcação do ADN com ³⁵S dATP

A primeira aproximação de sucesso na quantificação de ADN complexado com polímero, consistiu em marcar o ADN plasmídico com o nucleótido dATP contendo na

sua composição o radioisótopo ^{35}S . Os resultados ilustrados na Figura 2.7 demonstram que é possível obter um aumento proporcional dos valores de emissão β (cpm ou contagem por minuto) com concentrações crescentes do ADN plasmídico, sendo observado um coeficiente de determinação elevado (0,9984). Resultados adicionais demonstraram também que a presença de lipossomas marcados com Rh-PE não interferem com esta leitura (resultados não apresentados).

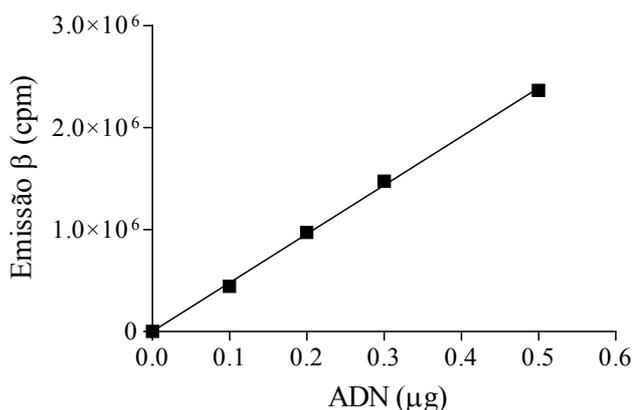


Figura 2.7- Curva de calibração com plasmídeo marcado com ^{35}S

O ADN marcado com o radioisótopo ^{35}S foi diluído em água destilada de modo a obter diferentes concentrações de ADN, tendo-se adicionado de seguida líquido de cintilação a cada amostra, procedendo à sua análise num contador de cintilações. A descrição da variação da emissão (cpm) em função da quantidade de ADN foi determinada por regressão linear, permitindo determinar as equações da recta assim como o respectivo coeficiente de determinação ($y = (4\,775\,000 \pm 68\,000)x - 201 \pm 18\,700$; $r^2 = 0,9984$).

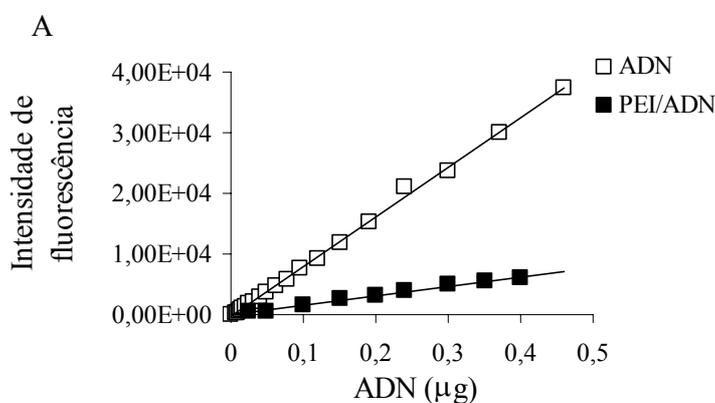
Assim, através deste processo de quantificação foi possível elaborar uma pré-selecção das condições mais promissoras em termos de eficiência de recuperação do ADN plasmídico. Após esta selecção inicial, houve necessidade de se estabelecer um método alternativo para quantificação do ácido nucleico, devido às limitações inerentes à utilização de radioisótopos em culturas celulares e em cobaias, no laboratório de trabalho.

ii. Marcação do ADN com Cy3

O método de marcação do ADN plasmídico com Cy3 foi utilizado na construção de curvas padrão adequadas para quantificação de ADN livre. Contudo, existem vários factores que podem condicionar o valor da intensidade de fluorescência do ADN marcado com a sonda Cy3. Por exemplo, a sua complexação com o polímero PEI,

resulta numa acentuada diminuição dos valores de fluorescência do ADN, quando comparado com os valores obtidos com ADN livre (não complexado) (Figura 2.8 A). Deste modo, a sensibilidade do método é drasticamente reduzida, o que se reflecte pela diminuição do declive da recta de calibração correspondente (de 82 182 para 15 523). Adicionalmente, demonstrou-se que a presença de lipossomas também influencia o valor da fluorescência do ADN, mesmo na presença de detergentes (normalmente utilizados para promoverem a desestabilização lipossómica e assim diminuir fenómenos de dispersão de luz (resultados não mostrados)).

Apesar das referidas interferências, foi possível estabelecer uma regressão linear, com um elevado coeficiente de determinação (0,998), entre a intensidade da fluorescência e a quantidade de ADN, sendo que o ADN se encontra complexado com o polímero PEI, e que a medição foi efectuada na presença de quantidades constantes de lípido e de detergente $C_{12}E_8$. Estes resultados foram obtidos, quer com lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL, quer com lipossomas sensíveis ao pH compostos por DOPE/CHEMS, tendo-se testado uma janela de concentrações de ADN entre 0,028 e 0,55 μg por μmol de lípido total (Figura 2.8 B).



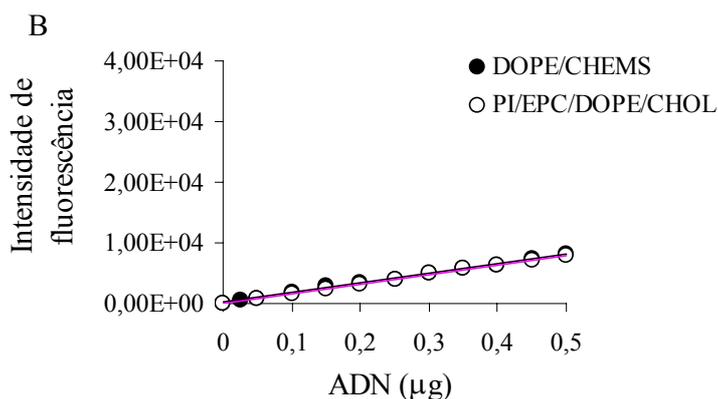


Figura 2.8- Curvas padrão obtidas a partir de ADN plasmídico marcado com Cy3

O ADN plasmídico foi previamente marcado com Cy3 e misturado com ADN não marcado (ADN) numa percentagem de 5 % em relação ao ADN total. A intensidade de fluorescência resultante de diluições sucessivas dessa solução foi determinada utilizando um comprimento de onda de excitação de 420 nm e um comprimento de onda de emissão de 549, num fluorímetro SPEX. Paralelamente, determinou-se a intensidade de fluorescência de soluções contendo várias quantidades de ADN após complexação com PEI na razão molar N/P de 10 (PEI/ADN) (A). Adicionalmente, testou-se a influência de lipossomas compostos por DOPE/CHEMS ou por PI/EPC/DOPE/CHOL nos valores de fluorescência emitida por ADN complexado com PEI, tendo-se utilizado 0,9 µmol de lípido em 2 mL de solução de análise (correspondente a uma concentração final de 0,45 mM) (B). A análise por regressão linear permitiu determinar as equações das rectas assim como os respectivos coeficientes de determinação (ADN: $y = 82\,182x - 312,69$; $r^2 = 0,9986$), (PEI/ADN: $y = 15\,523x + 32,937$; $r^2 = 0,9938$), (DOPE/CHEMS: $y = 15\,988x + 151,3$; $r^2 = 0,9984$) e (PI/EPC/DOPE/CHOL: $y = 1\,6073x - 20$; $r^2 = 0,9983$).

No entanto, verificou-se que a sensibilidade do método é baixa, de tal modo que alguns dos resultados obtidos relativos às eficiências de encapsulação são frequentemente irreproduzíveis, o que de resto é concordante com o facto de a determinação do valor do sinal mínimo detectável para um intervalo de certeza superior a 89 % (4470) ser superior a alguns dos valores de trabalho, ou seja, para o referido intervalo alguns valores encontram-se abaixo do limite de detecção.

Por este motivo, teve de se considerar um método alternativo de quantificação do ADN.

iii. Brometo de etídio

Como alternativa aos métodos anteriormente referidos, testou-se uma metodologia resultante da conjugação de 2 procedimentos. Assim, procedeu-se primeiro à descondensação do ADN através da utilização de um reagente aniónico, o qual apresenta uma afinidade superior para o PEI do que o ADN, deixando o ácido nucleico disponível, para numa segunda fase ser quantificado pelo reagente brometo de etídio. Nesse sentido, começou-se por determinar a concentração mínima do reagente aniónico

PMAA (ácido poli (metacrílico)) necessária para permitir o acesso completo do BrEt ao ADN. Os resultados demonstram que a utilização de PMAA na concentração de 125 μM foi suficiente para expor completamente o ADN utilizado na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, previamente complexado com PEI, na razão molar N/P 38 (Figura 2.9).

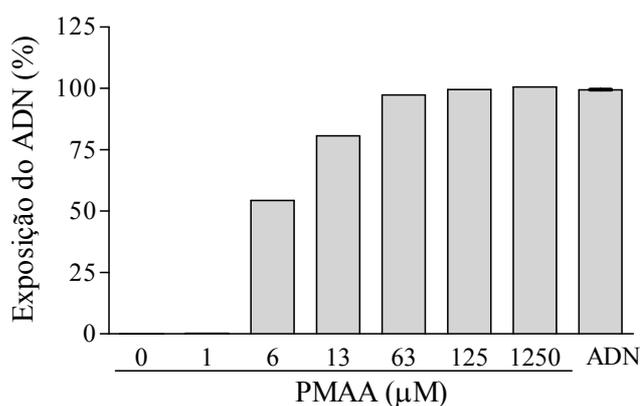


Figura 2.9- Concentração mínima de PMAA necessária para expor ao brometo de etídio o ADN complexado com PEI

Os poliplexos de PEI/ADN, preparados na razão molar N/P de 38, foram incubados com concentrações crescentes de PMAA, e subsequentemente analisados por fluorimetria após incubação com o BrEt, sendo que a intensidade de fluorescência resultante foi determinada utilizando um comprimento de onda de excitação de 518 nm (*slit* 1) e um comprimento de onda de emissão de 605 nm (*slit* 2). Os valores de fluorescência resultantes foram normalizados para o valor de fluorescência correspondendo ao ADN livre incubado com BrEt.

Os valores de fluorescência obtidos permitem obter rectas de calibração cujo declive (28799) é superior à das rectas obtidas por marcação com Cy3 (15523), um indicador da sensibilidade do método. É de realçar que este novo procedimento apresenta ainda a vantagem de ser mais económico.

Apesar dos lipossomas e detergentes utilizados interferirem com a fluorescência do ADN marcado com BrEt, é possível obter curvas padrão com quantidades crescentes de PEI/ADN, mantendo constantes a quantidade de lípido total (0,1 mM) quer com lipossomas compostos por DOPE/CHEMS quer com lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL (Figura 2.10). A janela de concentração de ADN testada nestas curvas de calibração variou entre 0,5 μg de ADN por μmol de lípido total e 5 μg de ADN por μmol de lípido total.

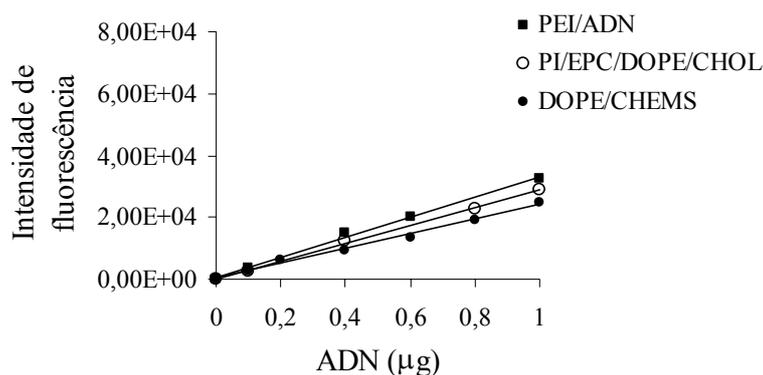


Figura 2.10- Curvas padrão de ADN plasmídico obtidas por quantificação pelo reagente brometo de etídio

O ADN complexado com PEI na razão molar de 10 foi incubado com PMAA durante 1 hora, após o que se procedeu à adição de BrEt. A intensidade de fluorescência resultante das diferentes concentrações de ADN em análise foi determinada utilizando um comprimento de onda de excitação de 518 nm (*slit* 1) e um comprimento de onda de emissão de 605 nm (*slit* 2). Paralelamente, analisou-se a fluorescência resultante da adição de quantidades constantes de lipossomas (0,2 µmol de lípido total num volume de 2 mL), tendo-se testado lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL e por DOPE/CHEMS. A análise por regressão linear permitiu determinar as equações das rectas assim como o respectivos coeficientes de determinação (PEI/ADN: $y = 32295x + 667,8$; $r^2 = 0,9959$), (PI/EPC/DOPE/CHOL: $y = 28799x - 0,832$; $r^2 = 0,9984$) e (DOPE/CHEMS: $y = 23886x + 328,68$; $r^2 = 0,9919$).

Para formulações apresentando baixa eficiência de encapsulação, os resultados relativos à quantificação de ADN com o referido procedimento apresentam baixa fiabilidade uma vez que o sinal mínimo detectável para um intervalo de certeza superior a 89 % (50200) é por vezes superior aos valores de trabalho.

iv. Reagente PicoGreen

A utilização do reagente PicoGreen foi efectuada de um modo semelhante à do reagente brometo de etídio.

A intensidade da fluorescência do ADN livre incubado com PicoGreen (Figura 2.11) é superior ao valor observado após marcação com Cy3 (Figura 2.8), indicando uma maior sensibilidade deste método no processo de quantificação.

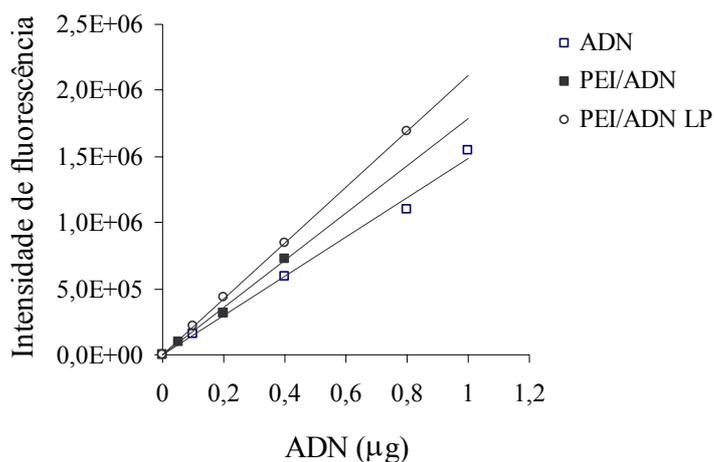


Figura 2.11- Curvas padrão de ADN plasmídico obtidas por quantificação com o reagente PicoGreen

O ADN complexado com PEI numa razão molar de 38 foi incubado com PMAA, após o que se adicionou o reagente PicoGreen. A intensidade de fluorescência resultante das diferentes concentrações de ADN em análise foi determinada, tendo-se analisado paralelamente a fluorescência resultante da adição de quantidades constantes de lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL (0,2 µmol de lípido total num volume de 2 mL), utilizando-se para tal um comprimento de onda de excitação de 480 nm e um comprimento de onda de emissão de 520 nm. A análise por regressão linear permitiu determinar as equações das rectas, assim como os respectivos coeficientes de determinação (ADN: $y = 10^6x - 556$; $r^2 = 0,9936$), (PI/EPC/DOPE/CHOL: $y = 2 \times 10^6x + 4789$; $r^2 = 0,9999$) e (PEI/ADN: $y = 2 \times 10^6x - 4301$; $r^2 = 0,9938$).

No que respeita aos factores interferentes nos valores de fluorescência, nem os lipossomas, nem o PMAA emitem fluorescência, mesmo na presença de PicoGreen. Contudo, quando o ADN é adicionado à mistura referida, todos os compostos indicados interferem com os valores de fluorescência (resultados não mostrados).

Apesar destas interferências, é possível obter curvas padrão com ADN complexado com PEI, na presença de PMAA, com um bom coeficiente de determinação ($> 0,99$), na presença ou ausência de lipossomas. Contudo, os declives das diferentes curvas de calibração (obtidas com ADN livre, com ADN complexado com PEI, ou com poliplexos na presença de lipossomas) diferem entre si, o que implica que no processo de quantificação do ADN associado aos lipossomas se tenham de construir curvas padrão na presença de poliplexos, de lipossomas e do detergente $C_{12}E_8$ (Figura 2.11), à semelhança do que se efectuou nas metodologias anteriores.

A adaptação do ensaio com o reagente PicoGreen demonstrou ser o melhor dos métodos analisados, apresentando a sensibilidade mais elevada, tal como demonstrado pelos declives das diferentes curvas de calibração. Assim, as curvas de calibração obtidas com ADN complexado com PEI, na presença de lipossomas, apresentam um

declive 62 vezes superior aos declives obtidos com o procedimento do BrEt. Para além disso, a utilização do reagente PicoGreen é compatível com a utilização da Rh-PE inserida na bicamada lipídica dos lipossomas, uma vez que os seus espectros de absorção e emissão não se sobrepõem. O sinal mínimo detectável para um intervalo de certeza superior a 89 % é de aproximadamente 4400 unidades de fluorescência, valor muito inferior às leituras obtidas. A janela de concentração de ADN testada nestas curvas de calibração variou entre 0,25 μg de ADN por μmol de lípido total e 5 μg de ADN por μmol de lípido total.

2.3.2.2. Purificação de lipopolíplexos em coluna de Sefarose CL-4B

O método da cromatografia de exclusão molecular foi utilizado neste contexto para remoção dos políplexos não associados aos LPPX. A Figura 2.12 demonstra que a eluição de lipopolíplexos (contendo ADN marcado radioactivamente e lipossomas marcados com Rh-PE) em colunas de Sefarose CL-4B permitiu observar 2 picos de radioactividade. O primeiro pico surge nas fracções 8 e 9, onde os lipossomas são eluídos, e o outro pico surge nas fracções 16, 17 e 18. Estes resultados sugerem que os políplexos não associados a lipossomas são eluídos principalmente nas fracções 16, 17 e 18, e que a radioactividade observada nas fracções 8 e 9 corresponde a políplexos fisicamente associados aos lipossomas.

Para reforçar esta ideia, analisou-se o padrão de eluição de políplexos na ausência de lipossomas, tendo os resultados demonstrado que estes são eluídos a partir da fracção 14, significando como tal que o pico observado nas fracções 8 e 9 no caso de eluição dos LPPX corresponde de facto a ADN que se encontra associado a lipossomas (Figura 2.12).

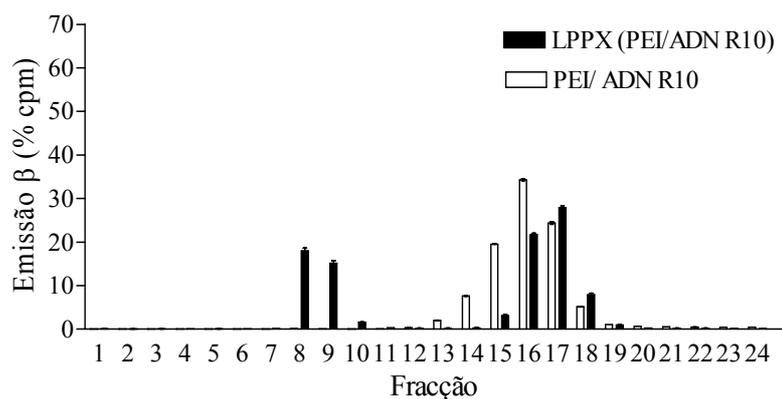


Figura 2.12- Purificação de LPPX- remoção de poliplexos não associados

Os LPPX foram preparados utilizando lípidos na concentração de 18,5 mM e ADN na concentração de 100 µg/mL, complexado com PEI na razão N/P de 10 (LPPX (PEI/ADN R10)) tendo os lipossomas sido marcados com Rh-PE e o ADN com ³⁵SdATP. Os LPPX foram depois eluídos em colunas de Sefarose CL-4B, e as fracções de 0,5 mL foram analisadas num contador de cintilações. Paralelamente, procedeu-se à eluição e análise das fracções de poliplexos de PEI/ADN preparados na razão N/P de 10 (PEI/ADN R10).

2.3.2.3. Métodos de preparação dos lipopoliplexos: Factores que influenciam a eficiência de recuperação do ADN

Numa fase inicial, a identificação dos factores que podem influenciar a associação do ADN aos lipossomas foi efectuada por marcação radioactiva do ácido nucleico.

Um dos parâmetros testados foi a composição lipídica. Assim, uma das composições inclui maioritariamente lípidos neutros, enquanto que a outra contém fosfatidilinositol, um lípido aniónico ao pH de trabalho (7,4). Os resultados ilustrados na Figura 2.13 demonstram que, para todas as condições analisadas, as formulações contendo PI apresentam eficiências de recuperação do ADN mais elevadas do que as correspondentes formulações sem este lípido, o que provavelmente se deve à interacção favorecida entre a carga negativa dos lipossomas e a carga positiva dos poliplexos. Para cada uma das composições referidas, testaram-se duas concentrações lipídicas (28 e 18,5 mM) e os quatro métodos de encapsulação distintos já referidos, que incluem (A) a evaporação de fase reversa (REV); (B) o congelamento/descongelamento dos lipossomas após hidratação directa do filme lipídico com a suspensão contendo os poliplexos (FT); (C) a combinação da evaporação de fase reversa seguida de congelamento/descongelamento dos lipossomas (REV-FT) e (D) a hidratação directa do filme lipídico com a suspensão contendo os poliplexos (hidratação). No caso específico dos lipopoliplexos contendo PI (-), os métodos REV (A), FT (B) e REV-FT (C)

resultaram em eficiências de recuperação do ADN semelhantes para a concentração de lípido de 28 mM. A diminuição da concentração lipídica para 18,5 mM levou a uma diminuição da recuperação do ADN aquando da aplicação do método FT (B), mas levou a um aumento acentuado da recuperação deste no caso do método REV-FT (C).

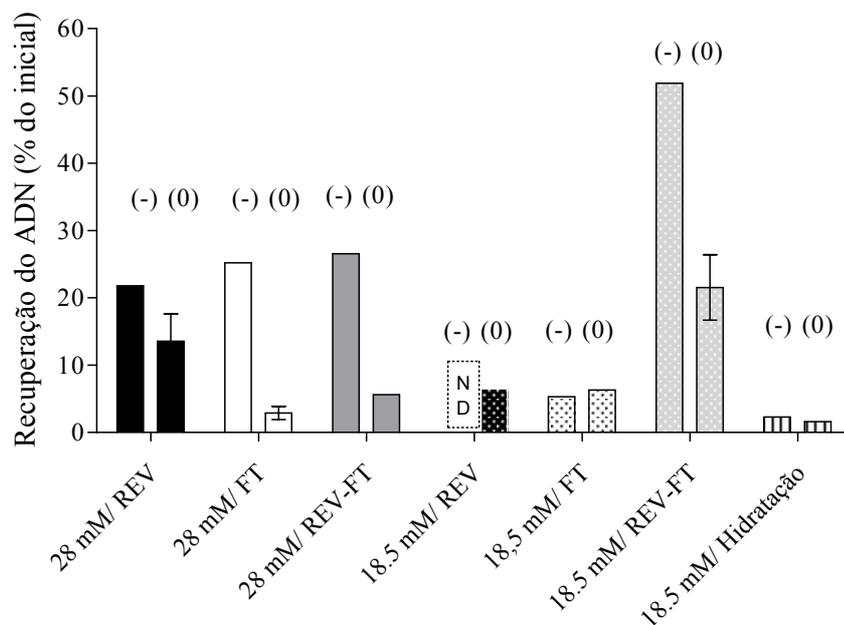


Figura 2.13- Recuperação do ADN em função do método de preparação dos LPPX, da concentração e composição lipídica

Os LPPX foram preparados utilizando uma concentração de ADN de 100 µg/mL complexado com PEI numa razão N/P de 38, e duas concentrações iniciais de lípido (18,5 mM e 28 mM). Para cada concentração, testou-se a recuperação do ADN, quer em lipossomas compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL (-) quer em lipossomas compostos por EPC/DOPE/CHOL (0). Foram testados quatro métodos de preparação de LPPX: método de evaporação de fase reversa (REV); hidratação do filme lipídico seguida de congelamento/descongelamento (FT); método de evaporação de fase reversa seguida de congelamento/descongelamento (REV-FT) e hidratação do filme lipídico (hidratação). A eficiência da recuperação do ADN (%) foi determinada com base na percentagem dos valores de contagens por minuto (cpm) quantificados em amostras recolhidas após eluição em coluna de Sefarose (ou seja, após eliminação de poliplexos não associados), relativamente aos valores de cpm obtidos para amostras correspondentes mas adquiridas imediatamente após a hidratação do filme lipídico. O símbolo (-) refere-se a lipossomas compostos por lípidos neutros e negativos e (0) refere-se a lipossomas compostos e por lípidos neutros. ND diz respeito a valores não determinados.

No que respeita a lipossomas neutros (0), a eficiência de recuperação mais elevada, foi obtida com o método REV aquando da utilização da concentração de 28 mM. Diminuindo a concentração de lípido para 18,5 mM a recuperação de ADN mais eficiente foi conseguida com o método REV-FT.

O método da hidratação demonstrou ser uma opção a não considerar, uma vez que conduziu à eficiência de recuperação do ADN mais baixa, tanto para lipossomas neutros, como para lipossomas contendo PI.

No seu conjunto, estes resultados permitiram seleccionar a condição de preparação respeitante à concentração de lípido de 18,5 mM, como sendo a mais favorável à recuperação do ADN, quando utilizada com o método da evaporação reversa seguido de congelamento/descongelamento (C), tanto para lipossomas neutros (0) como para lipossomas contendo o lípido de carga negativa, PI (-).

Tal como referido anteriormente, foi necessário encontrar métodos alternativos de quantificação de ADN, sem que se recorresse à radioactividade, permitindo desse modo efectuar quantificações da variação da concentração de ADN e de lípido na mesma amostra. Deste modo, é possível a determinação da eficiência de recuperação do ADN ($\% R_{ADN}$) corrigida para a variação da concentração do lípido ($\% R_L$) e assim calcular a eficiência de associação do ADN aos lipossomas (EA). Assim, após determinar a concentração de lípido mais favorável (18,5 mM), assim como o método de preparação mais adequado (método C), testou-se, no caso da formulação contendo o lípido PI, a influência da variação da razão N/P dos poliplexos, na eficiência de associação do ADN a lipossomas. Os resultados ilustrados na Figura 2.14 demonstram que quando os lipopoliplexos são preparados nas razões N/P de 38 e de 20, a eficiência de associação não sofre grandes alterações, sendo a média aproximadamente de 85 e 95 %, respectivamente.

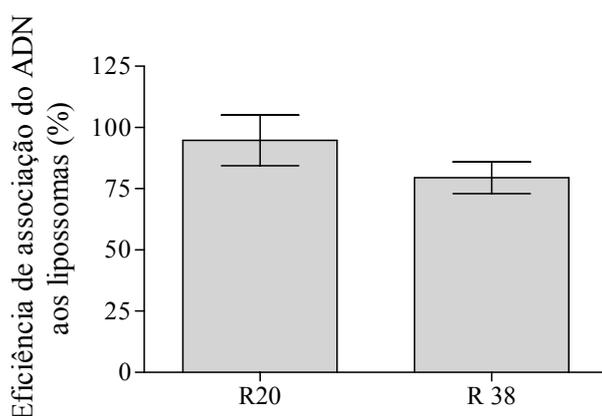


Figura 2.14- Eficiência de associação de ADN a lipossomas em função da razão N/P

A eficiência de associação foi determinada com base nos valores de recuperação do ADN pelo método do brometo de etídio, e com base nos valores de recuperação de lípido por recurso ao *kit* Infinity. Os LPPX foram preparados pelo método REV/FT, utilizando uma concentração inicial

de lípido de 18,5 mM e uma concentração de ADN de 100 µg/mL, complexado com PEI nas razões molares N/P de 20 (R20) e 38 (R38).

2.3.2.4. Efeito do método REV/FT na integridade e na actividade do ADN

i. Efeito do éter

De modo a avaliar os efeitos do método de evaporação de fase reversa na integridade do ADN, incubou-se uma solução contendo ADN na concentração de 100 µg/mL com éter dietílico, com o objectivo de simular as condições aplicadas na preparação de lipopolíplexos. O ADN foi de seguida analisado por electroforese em gel de agarose e o perfil resultante (ED) comparado com o obtido para o mesmo plasmídeo em condições controlo (Ctr) (ausência de éter). Os resultados revelam a existência de 2 bandas, correspondentes a plasmídeo enrolado e plasmídeo super-enrolado. As bandas obtidas na condição controlo e na condição resultante da incubação com éter são idênticas, indicando a ausência de danos (cisão) provocados pelo éter no plasmídeo (Figura 2.15).

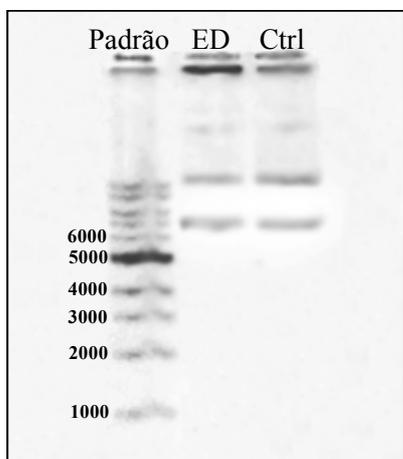


Figura 2.15- Efeito do éter dietílico na integridade do plasmídeo

Preparou-se uma solução de ADN na concentração de 100 µg/mL em solução de glicose a 5 %, tendo-se incubado um volume de 0,6 mL com éter dietílico (0,4 mL). A solução resultante foi posteriormente evaporada num evaporador rotativo utilizando um banho de água a 40 °C, durante 120 minutos. Após esse período, misturou-se o ADN com *loading buffer* e procedeu-se à sua análise por electroforese em gel de agarose, tendo-se procedido em paralelo à análise de uma quantidade igual de plasmídeo controlo (plasmídeo não sujeito a estas condições experimentais), tal como descrito na secção de “Materiais e métodos”.

Para demonstrar inequivocamente a integridade e funcionalidade do ADN após contacto com o éter, este foi utilizado posteriormente na transfecção de células HEK-

293 após complexação com lipossomas catiónicos, na presença (complexos ternários) ou ausência (lipoplexos) de transferrina. A eficiência de transfecção foi comparada com a obtida com ADN sem contacto prévio com o éter. A eficiência de transfecção é idêntica nas duas condições, indicando que o éter não altera a capacidade de expressão do plasmídeo (Figura 2.16), conforme indicado pela análise estatística, em que o valor de p indica uma probabilidade de 42 % dos valores serem idênticos. No entanto, importa realçar que a incubação de poliplexos (PEI/ADN) pré-formados com éter dietílico, previamente à sua adição às células, resulta numa diminuição da eficiência de transfecção (resultados não mostrados). Como os resultados anteriormente apresentados indicam que o ADN não é destruído, pode acontecer que, na presença de éter, o polímero promova a adesão do ADN às paredes dos tubos de vidro, o que dificulta a sua recuperação, e induzindo consequentemente uma diminuição da sua concentração.

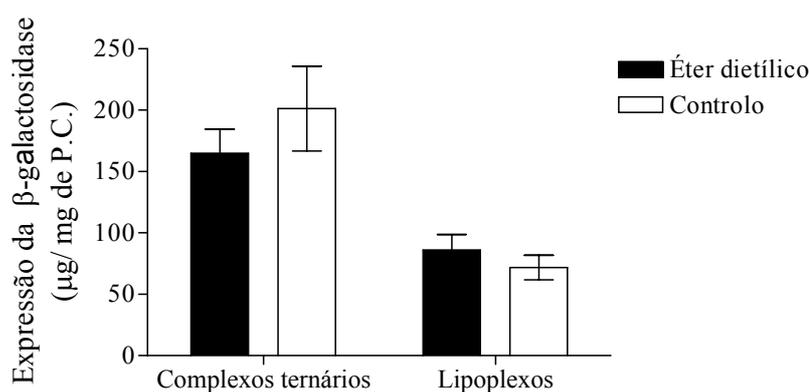


Figura 2.16- Efeito do éter dietílico na actividade do plasmídeo

O ADN, utilizado numa concentração de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ em solução de glicose a 5 %, foi incubado com éter dietílico e sujeito a evaporador rotativo, utilizando um banho de água a 40°C , durante 120 minutos. Após esse período, o ADN foi complexado com PEI numa razão molar N/P de 38 e de seguida incubado com células HEK-293 ($1 \mu\text{g}$ ADN/poço), previamente semeadas em placas de 48 poços. Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo e depois de 48 horas as células foram lavadas e lisadas para posterior análise para determinação da quantidade de β -galactosidase e da proteína celular. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,4236 após comparação dos valores correspondentes às condições éter dietílico e controlo (complexos ternários).

ii. Efeito do congelamento/descongelamento

Surpreendentemente, o processo de FT induziu um aumento acentuado da eficiência de transfecção mediada pelos poliplexos. Tem sido descrito que este processo pode resultar no aumento do tamanho dos complexos, na ausência de excipientes crioprotectores, e que este efeito pode ser acompanhado da diminuição da eficiência de

transfecção³⁵. Contudo, a presença de substâncias crioprotectoras, tais como determinados açúcares, inibe a agregação dos poliplexos durante o processo de congelamento/descongelamento, daí resultando a manutenção dos níveis de transfecção³⁵.

Os resultados obtidos mostram, ao contrário do esperado, que o processo de congelamento/descongelamento, apesar de efectuado na presença de glicose a 5 % induziu alterações nas partículas, originando poliplexos com eficiências de transfecção mais elevadas (Figura 2.17). De qualquer modo, importa realçar que este processo não afecta negativamente a capacidade de transfecção mediada pelos poliplexos, viabilizando a aplicação da técnica de congelamento/descongelamento no processo de preparação dos LPPX.

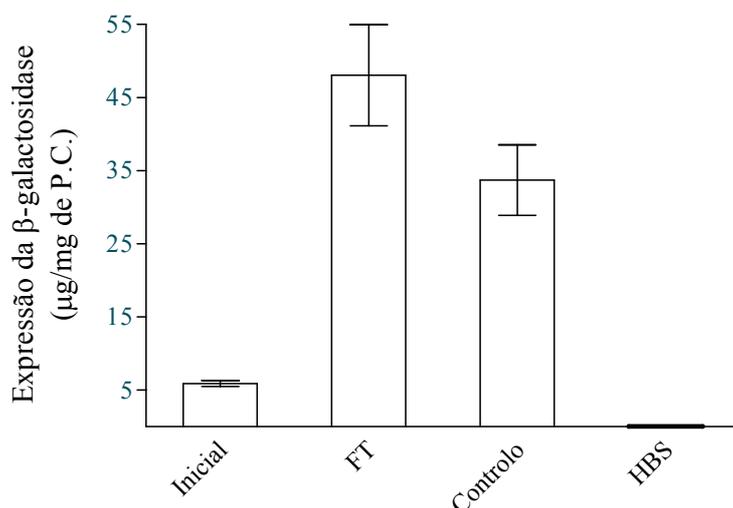


Figura 2.17- Efeito do método de congelamento/descongelamento na actividade de transfecção do plasmídeo

O ADN, utilizado na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e complexado com PEI numa razão molar N/P de 38, em solução de glicose a 5 %, foi sujeito a 7 ciclos de congelamento/descongelamento (FT), sendo subsequentemente incubado com células HEK-293 (1 μg ADN/poço), previamente semeadas em placas de 48 poços. Como controlo desta condição utilizaram-se poliplexos preparados nas mesmas condições, mas que não foram sujeitos a ciclos de congelamento/descongelamento (Inicial). O controlo positivo da transfecção consistiu em complexos ternários compostos por DOTAP/CHOL, ADN e transferrina (Controlo). Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo e depois de 48 horas as células foram lavadas e lisadas para determinação da quantidade de β -galactosidase e de proteína celular. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0259 após comparação dos valores correspondentes às condições (Inicial) e (FT). Dado as variâncias dos grupos analisados não poderem ser consideradas idênticas para um valor de p < 0,05, o teste t foi aplicado com a correcção de Welch's.

2.3.3. Acoplamento da transferrina

Após determinação das condições mais favoráveis à associação de ADN a lipossomas, prosseguiu-se com a optimização das condições experimentais relacionadas com o acoplamento do ligando transferrina aos lipopolíplexos. Para efectuar este passo, utilizou-se como espaçador o polímero PEG, tendo sido testados dois procedimentos diferentes. Numa primeira abordagem utilizou-se PEG monofuncional, caracterizado pela presença de um grupo maleimida reactivo numa das extremidades, tal como descrito na secção “Materiais e métodos”, subsecção 2.2.11.1. Esta molécula encontra-se conjugada a um lípido, o que permite a sua inclusão nos LPPX aquando da formação do filme lipídico. Alternativamente, utilizou-se uma molécula de PEG heterofuncional, a qual é incluída nos LPPX por intermédio de uma reacção covalente entre o seu grupo reactivo NHS (N-hidroxisuccinimida) e as amins primárias do lípido DOPE incluído na membrana lipídica, deixando disponível na outra extremidade um grupo maleimida reactivo. A utilização desta estratégia implica a purificação dos LPPX para remoção das moléculas de PEG não acoplado, tal como descrito na secção “Materiais e métodos”, subsecções 2.2.11.2 e 2.2.11.3. Os passos subsequentes são comuns a ambos os procedimentos, e implicam a tiolação (activação) da transferrina, tornando-a apta para reagir com o grupo maleimida existente na extremidade livre da molécula de PEG.

2.3.3.1. Eficiência da activação da transferrina

A activação da transferrina foi efectuada com o composto 2-iminotiolano. Este processo de activação consiste na adição de grupos tiol à transferrina, os quais são responsáveis, no passo subsequente, pela reacção com o grupo maleimida associado à molécula de PEG. De modo a determinar as condições que permitem a adição de uma quantidade adequada de grupos tiol à transferrina, testou-se a incubação desta proteína com o agente de activação em três razões molares. Os resultados apresentados na Figura 2.18 demonstram que, utilizando a razão molar de 5, se obtém, em média, 2,4 grupos tiol por molécula de transferrina. Razões molares mais elevadas deram origem a um maior número de grupos tiol. Contudo, e apesar de tais resultados poderem aumentar a eficiência de acoplamento transferrina/PEG, também aumentam a probabilidade da mesma molécula de transferrina interagir com múltiplos grupos maleimida, podendo conduzir a alterações na sua conformação e assim comprometerem a interacção com o respectivo receptor.

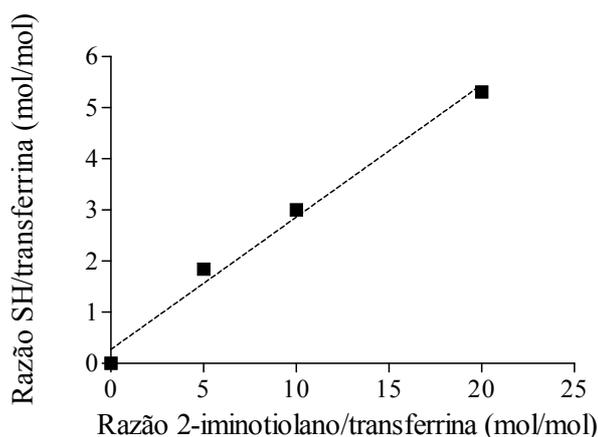


Figura 2.18- Efeito da razão 2-iminotiolano/transferrina na sua eficiência da activação

A transferrina foi incubada com 2-iminotiolano em razões crescentes, após o que este composto foi removido através de uma coluna de Sefadex G25. A quantidade de grupos tiol adicionados à transferrina foi detectada com o reagente DTNB, recorrendo a uma curva de calibração obtida com diferentes concentrações do padrão GSH. As leituras foram efectuadas num espectrofotómetro utilizando um comprimento de onda de 402 nm.

2.3.3.2. Avaliação dos parâmetros de formulação na eficiência de acoplamento da transferrina

Tal como ilustrado na Figura 2.19 A, a percentagem de DSPE-PEG-Mal utilizada na preparação dos LPPX segundo o procedimento descrito na secção “Materiais e métodos”, subsecção 2.2.11.1, influencia a eficiência de acoplamento da transferrina. Assim, e tal como esperado, o aumento da quantidade de PEG reactivo incorporado nos LPPX conduz a um aumento da quantidade de transferrina acoplada à superfície dos transportadores.

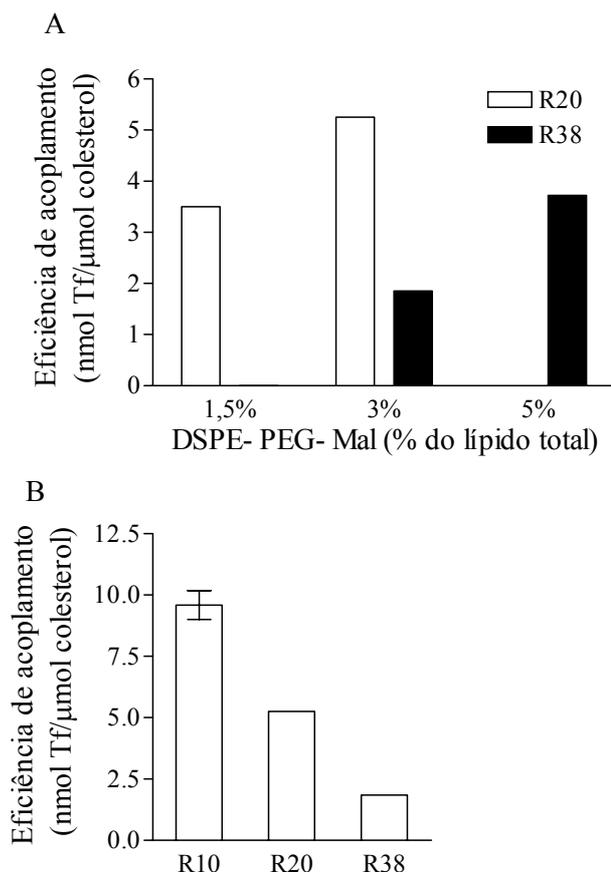


Figura 2.19- Influência da percentagem de PEG reactivo e da razão N/P na eficiência de acoplamento da transferrina

Os LPPX foram preparados a partir de filmes lipídicos compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL e contendo diferentes percentagens de PEG reactivo (DSPE-PEG-Mal). Os poliplexos a associar aos lipossomas foram preparados nas razões N/P de 20 (R20) e 38 (R38), utilizando como ponto de partida uma solução de ADN com uma concentração de 100 μ g/mL (A). Paralelamente, determinou-se a eficiência de acoplamento da transferrina em LPPX preparados com uma quantidade constante de PEG (3 %), e diferentes razões de N/P, tendo-se testado a razão 10 (R10), a razão 20 (R20) e a razão 38 (R38) (B). A eficiência de acoplamento foi determinada, tal como descrito na secção de “Material e métodos”.

A eficiência de acoplamento da transferrina é altamente dependente da quantidade inicial de PEI utilizada na complexação do ADN (Figura 2.19 B). Quanto maior a razão N/P utilizada, menor é a eficiência de acoplamento da transferrina (expressa como mol de proteína acoplada por mole de lípido). Para uma razão N/P de 10 a eficiência de acoplamento é de 10 nmol de transferrina por μ mol de colesterol, diminuindo para 5 e 2 nmol de transferrina por μ mol de colesterol quando os poliplexos são preparados nas razões N/P de 20 e 38, respectivamente (Figura 2.19 B). Considera-se que um de dois factores poderão justificar estes resultados: (i) um excesso de PEI

pode contribuir para que uma maior quantidade de moléculas de PEG reactivo fiquem retidas no interior dos lipossomas, estando assim indisponíveis para a reacção de acoplamento com a transferrina e/ou (ii) que para razões N/P elevadas possam existir moléculas de PEI à superfície dos LPPX, susceptíveis de interagir com os grupos Mal presentes na extremidade distal das moléculas de PEG, condicionado a sua disponibilidade para o acoplamento com a transferrina activada.

2.3.3.3. Substituição da molécula de DSPE-PEG-Mal por NHS-PEG-Mal

Após constatar que a razão N/P utilizada na preparação dos poliplexos influencia a eficiência de acoplamento da transferrina às moléculas de DSPE-PEG-Mal previamente incorporadas na superfície dos lipossomas, optou-se pela incorporação da molécula de PEG reactivo numa etapa posterior à preparação dos lipopoliplexos. Para tal, foi necessário substituir a molécula de PEG monofuncional DSPE-PEG-Mal, pela molécula de PEG heterofuncional NHS-PEG-Mal. Uma vez que esta molécula de PEG pode ser incorporada nos LPPX após remoção de poliplexos não encapsulados, considerou-se que este procedimento poderia minimizar a influência da polietilenimina na eficiência de acoplamento da transferrina. Por outro lado, este procedimento permite diminuir a quantidade de PEG no compartimento aquoso dos lipossomas, tendo como consequências um aumento de espaço que pode ser ocupado pelo ADN, daí podendo resultar um aumento da eficiência de associação desta molécula aos lipossomas.

A molécula de PEG heterofuncional apresenta numa das extremidades um grupo NHS, o qual reage com aminas primárias do lípido DOPE presente nos LPPX, e na outra extremidade o grupo Mal, o qual reage subsequentemente com os grupos tiol da transferrina activada.

A utilização deste tipo de molécula de PEG exige, no entanto, um passo adicional o qual consiste na remoção das moléculas de PEG que não reagiram com os LPPX. Para tal, recorreu-se novamente ao método da cromatografia de exclusão molecular, tendo sido utilizada para esse fim colunas contendo Sefarose CL-4B. Os resultados apresentados na Figura 2.20 demonstram que este método é eficiente na remoção do polímero, uma vez que este é eluído em fracções posteriores às fracções de eluição dos LPPX.

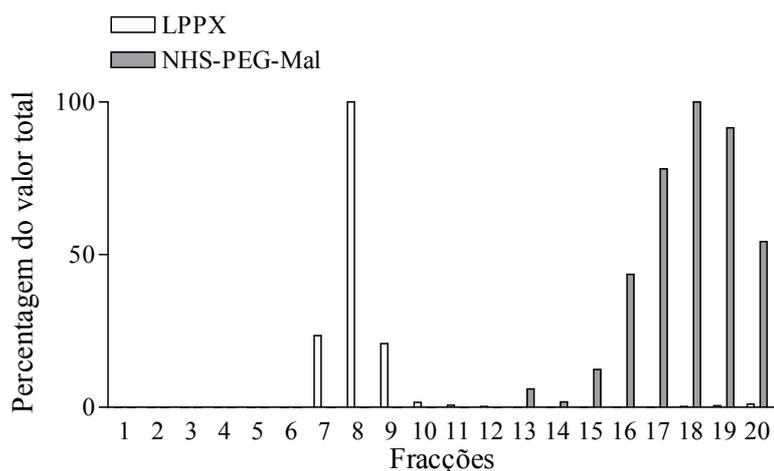


Figura 2.20- Comparação dos perfis de eluição de LPPX e PEG heterofuncional (NHS-PEG-Mal)

Os LPPX foram preparados utilizando uma concentração de ADN de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ complexado com PEI numa razão N/P de 38, e a concentração de lípido de 18,5 mM contendo Rh-PE na percentagem de 1 %. De seguida, estes foram eluídos em fracções de 0,5 mL, e o seu perfil de eluição foi avaliado por medição da fluorescência, e comparado com o perfil de eluição de uma solução de NHS-PEG-Mal, utilizada numa concentração de 3,5 mg/mL, tendo a sua detecção sido efectuada por medição da absorvância a 240 nm.

i. Disponibilidade dos grupos Mal à superfície dos lipossomas

Com o objectivo de determinar se este novo procedimento será eficiente no que respeita à disponibilidade dos grupos maleimida activos na superfície de LPPX, procedeu-se à detecção destes grupos, por incubação de LPPX (previamente conjugados com NHS-PEG-Mal) com quantidades crescentes de GSH. Os grupos SH foram quantificados e os resultados comparados com os valores obtidos após incubação das mesmas concentrações de GSH com quantidades constantes de LPPX não conjugados com a molécula de PEG heterofuncional. A diminuição da intensidade da absorvância para cada concentração de GSH reflecte a extensão da reacção dos grupos tiol com os grupos maleimida, e consequentemente dá uma indicação quantitativa da disponibilidade dos grupos maleimida à superfície dos LPPX-PEG-Mal. Os resultados obtidos (Figura 2.21) indicam que aumentando a quantidade de GSH incubada com os LPPX, aumenta a quantidade de GSH que reage com o grupo maleimida, sugerindo que a reacção referida está dependente de uma constante de equilíbrio, e como tal não é possível, com base nesta aproximação, determinar directamente a quantidade de PEG acoplado à superfície dos lipossomas. Ainda que não tenha sido possível quantificar a eficiência da acoplamento da molécula de PEG aos lipossomas, os resultados obtidos demonstram a presença e a disponibilidade de grupos maleimida à superfície dos

lipossomas, o que comprova inequivocamente que a conjugação da molécula de PEG aos lipossomas foi bem sucedida.

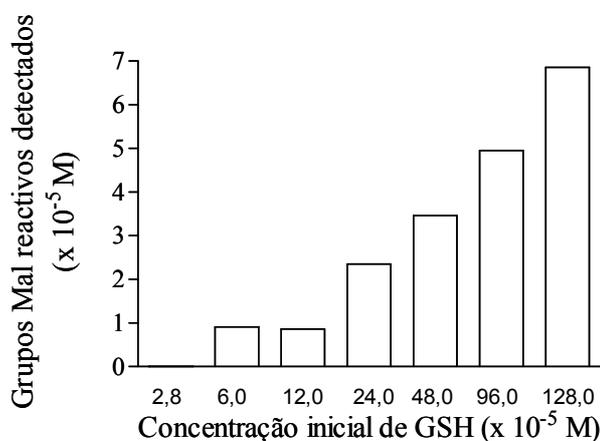


Figura 2.21- Detecção de grupos Mal à superfície de LPPX-PEG-Mal

Os LPPX foram preparados utilizando uma concentração de ADN de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ complexado com PEI na razão N/P de 38, e a concentração de lípido de 18,5 mM. Após purificação, os LPPX foram incubados com NHS-PEG-Mal durante 2 horas, à temperatura ambiente, e seguidamente purificados através da remoção das moléculas de PEG não acopladas. Os LPPX-PEG-Mal resultantes foram incubados com quantidades crescentes de GSH durante 30 minutos, após o que se procedeu à quantificação dos grupos GSH remanescentes, tal como descrito na secção de “Material e métodos”. A diferença de concentrações obtida comparativamente às soluções controlo (soluções de LPPX não conjugado a NHS-PEG-Mal) permite avaliar a disponibilidade de grupos maleimida à superfície dos LPPX-PEG-Mal para a reacção de acoplamento com a transferrina, designada no gráfico por “Grupos Mal reactivos detectados”.

2.3.4. Estudos de associação celular

De modo a testar a eficiência do novo procedimento de acoplamento da transferrina, procedeu-se à análise da associação celular de lipossomas vazios conjugados com o referido ligando. Para tal, as células foram analisadas por microscopia (por forma a permitir a visualização do processo de interacção lipossoma-célula) e por citometria de fluxo (no sentido de quantificar a extensão do processo de associação celular).

Estes estudos foram efectuados em células HEK-293, nas quais foi possível detectar receptores da transferrina em aproximadamente 100 % das células analisadas (resultados não apresentados), à semelhança do que ocorre em células tumorais.

Os resultados de microscopia demonstram que é possível observar diferenças na intensidade da fluorescência de células incubadas com lipossomas “vazios”, direccionados ou não direccionados, cuja preparação se encontra descrita na secção de

“Materiais e métodos”, subsecção 2.2.12. Deste modo, tanto os lipossomas sem PEG, como os lipossomas conjugados ao PEG mas sem transferrina, interagem fracamente com as células. Contudo, quando a transferrina é acoplada aos lipossomas, a sua capacidade de interação com as células aumenta consideravelmente, verificando-se que a partir de uma determinada quantidade de ligando acoplado, os níveis de associação se mantêm, indicando a quantidade máxima de transferrina que deve ser utilizada neste procedimento (resultados não mostrados).

Importa referir que a nova molécula de PEG conduziu a uma diminuição da quantidade de transferrina acoplada quando comparada com os níveis obtidos com a molécula de PEG monofuncional. Ainda assim, a eficiência de acoplamento da transferrina aos lipossomas foi de $1,9 \pm 0,7$ nmol de Tf por μmol colesterol, em lipossomas preparados com 5 mg NHS-PEG-Mal. Embora de um modo geral estes valores sejam inferiores aos apresentados na Figura 2.19, relativa à utilização de moléculas de PEG monofuncional, foi possível observar um perfil de associação às células claramente dependente da presença de transferrina acoplada aos lipossomas.

Os resultados de citometria de fluxo resultantes da incubação de lipossomas “vazios” marcados com Fluor-PE, com células HEK-293 demonstram que uma concentração de lípido total de $80 \mu\text{M}$ é insuficiente para que ocorra uma associação mínima às células. Um aumento da quantidade de lípido para $160 \mu\text{M}$ permite observar cerca de 12 % de células marcadas fluorescentemente (Figura 2.22).

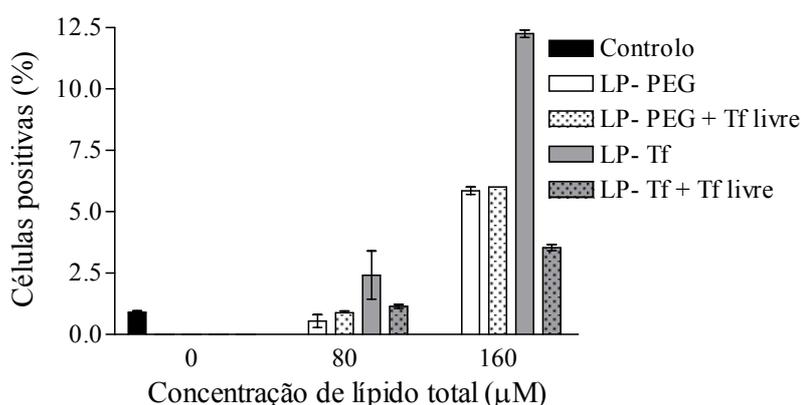


Figura 2.22- Associação celular mediada por lipossomas direccionados

Os lipossomas foram incubados com células HEK-293 na concentração de 80 e $160 \mu\text{M}$, durante 4 horas. Após esse período, as células previamente semeadas em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS e destacadas com tripsina, após o que se procedeu à sua diluição com solução de PBS contendo FBS a 20 %. De seguida, foram lavadas, ressuspensas em PBS e

analisadas por citometria de fluxo. A condição controlo corresponde a células que não foram incubadas com lipossomas, a condição LP-PEG corresponde a células incubadas com lipossomas contendo PEG, mas sem o ligando transferrina, ao passo que a condição LP-Tf corresponde a lipossomas conjugados com PEG e com o ligando transferrina. Nestas duas últimas condições, testou-se adicionalmente a presença de transferrina livre (20 µg/mL) (+ Tf livre), na eficiência de associação celular.

Quando as células são tratadas com um excesso de transferrina livre previamente à sua incubação com os lipossomas, verifica-se uma diminuição para menos de metade na extensão de associação celular no caso dos lipossomas direccionados, e uma ausência total de efeito para os lipossomas não direccionados. Estes resultados sugerem que a associação celular dos lipossomas direccionados ocorre numa extensão significativa através dos receptores de transferrina, e que a extensão de associação celular não específica verificada não envolve estes receptores (Figura 2.22).

2.3.4.1. Efeito da remoção de PEI adsorvido na associação celular dos LPPX

Paralelamente aos estudos de associação celular apresentados para os lipossomas “vazios” (não associados a poliplexos), foram realizados estudos semelhantes em lipopoliplexos. Para tal, utilizaram-se LPPX compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL e preparados na concentração de 9 mM, tendo-se procedido à hidratação directa do filme lipídico com uma solução de ADN na concentração de 50 µg/mL, previamente complexado com PEI na razão molar N/P de 38, após o que se procedeu a 7 ciclos de congelamento/descongelamento da amostra (secção “Materiais e métodos”, subsecção 2.2.11.2). A selecção deste procedimento em detrimento do processo REV/FT está relacionado com o facto de nunca se ter observado transfecção com lipopoliplexos preparados pelo processo de REV/FT (resultados não mostrados), apesar de, tal como descrito anteriormente, ser este o processo que conduz a maiores taxas de recuperação do ADN. Assim, foi necessário proceder à optimização do processo de hidratação do filme lipídico, nomeadamente através da diminuição da concentração inicial dos componentes.

Os resultados obtidos revelam um perfil de associação completamente diferente do observado com lipossomas vazios, não só porque a associação dos LPPX às células é bastante mais elevada do que a observada para os lipossomas, mas também porque esta ocorre de um modo independente da presença do ligando transferrina (resultados não mostrados). Estes resultados sugerem a presença de PEI adsorvido à superfície dos

LPPX, daí resultando interacções não específicas, provavelmente de natureza electrostática, com a membrana celular. Na tentativa de ultrapassar esta situação, procedeu-se à preparação de LPPX com políplexos contendo razões N/P inferiores a 38, tais como 20 e 10. No entanto, mesmo diminuindo a quantidade de polímero (PEI) inicial não foi possível atenuar a extensão de interacções não específicas dos lipopolíplexos direccionados, com as células em cultura.

De modo a solucionar este problema, optou-se pelo tratamento prévio das formulações com PMAA previamente à sua adição às células, numa tentativa de tirar proveito do facto deste ácido interagir fortemente com o PEI e daí poder resultar a sua dissociação da superfície dos lipopolíplexos. Pretendia-se, deste modo, garantir que a interacção lipopolíplexo/célula fosse mediada preferencialmente pelo ligando transferrina.

Numa primeira abordagem os políplexos foram incubados com PMAA e subsequentemente esta mistura foi eluída através de uma coluna de Sefarose CL-4B. As fracções eluídas foram incubadas directamente com o reagente PicoGreen. Tal como ilustrado na Figura 2.23, é possível detectar ADN livre nas fracções características (fracção correspondente a um volume de eluição de 4,5 mL), o que demonstra que a interacção entre PMAA e PEI resultou na deslocalização do ácido nucleico dos políplexos. Adicionalmente, foi possível detectar PEI a ser eluído em fracções posteriores, havendo indicação que este polímero se encontra complexado com o PMAA (resultados não mostrados).

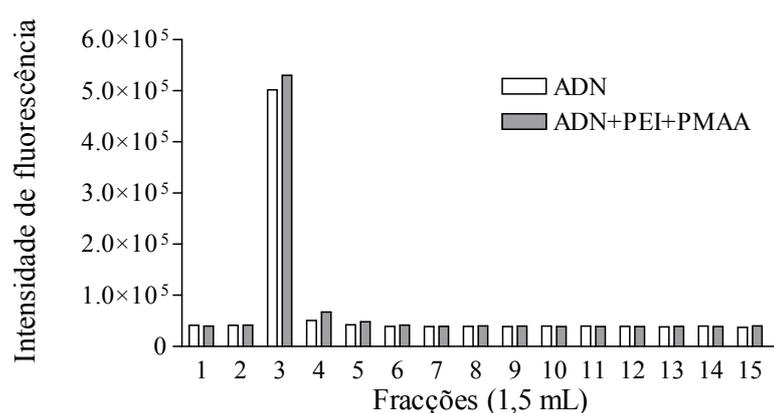


Figura 2.23- Efeito do PMAA na dissociação dos políplexos de PEI/ADN

Os LPPX de PEI/ADN foram preparados na razão N/P de 38 e incubados com PMAA durante 60 minutos. Após esse período, procedeu-se à sua eluição através de uma coluna de Sefarose CL-4B, e as fracções resultantes foram directamente incubadas com o reagente PicoGreen e analisadas por fluorimetria. Em paralelo, procedeu-se à eluição de uma solução de ADN na mesma concentração que a utilizada nas condições anteriores.

Após a obtenção destes resultados, os LPPX passaram a ser incubados com PMAA posteriormente à etapa de extrusão. A remoção de PEI/PMAA foi efectuada através da coluna de Sefarose CL-4B, seguida de ultra-centrifugação para remoção de ADN não encapsulado, permitindo simultaneamente a concentração dos LPPX de acordo com o descrito na secção “Materiais e métodos”, subsecção 2.11.3.1.

A utilização de PEG heterofuncional permite que este polímero só seja adicionado aos LPPX após o tratamento com PMAA, evitando-se assim o risco de desactivação ou interacções indesejáveis deste ácido com os grupos reactivos do PEG, nomeadamente o grupo maleimida.

Tal como pode ser observado nas imagens de microscopia confocal apresentadas na Figura 2.24, após este tratamento, os LPPX resultantes passaram a interagir com as células alvo de uma forma específica, à semelhança do observado com os lipossomas vazios. Estes resultados foram consistentes para as razões N/P de 10 e 38.

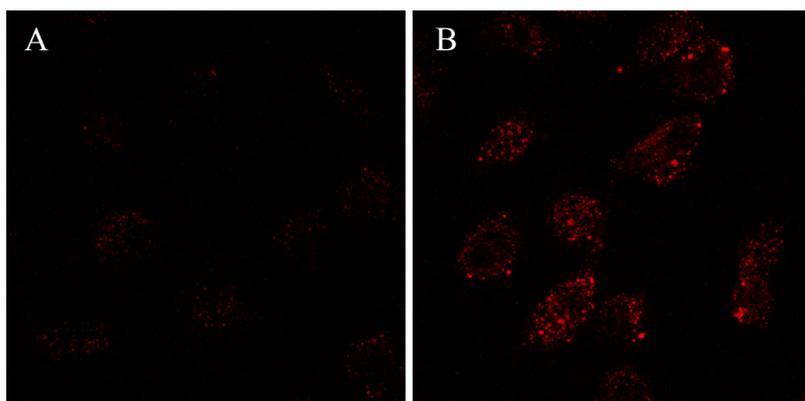


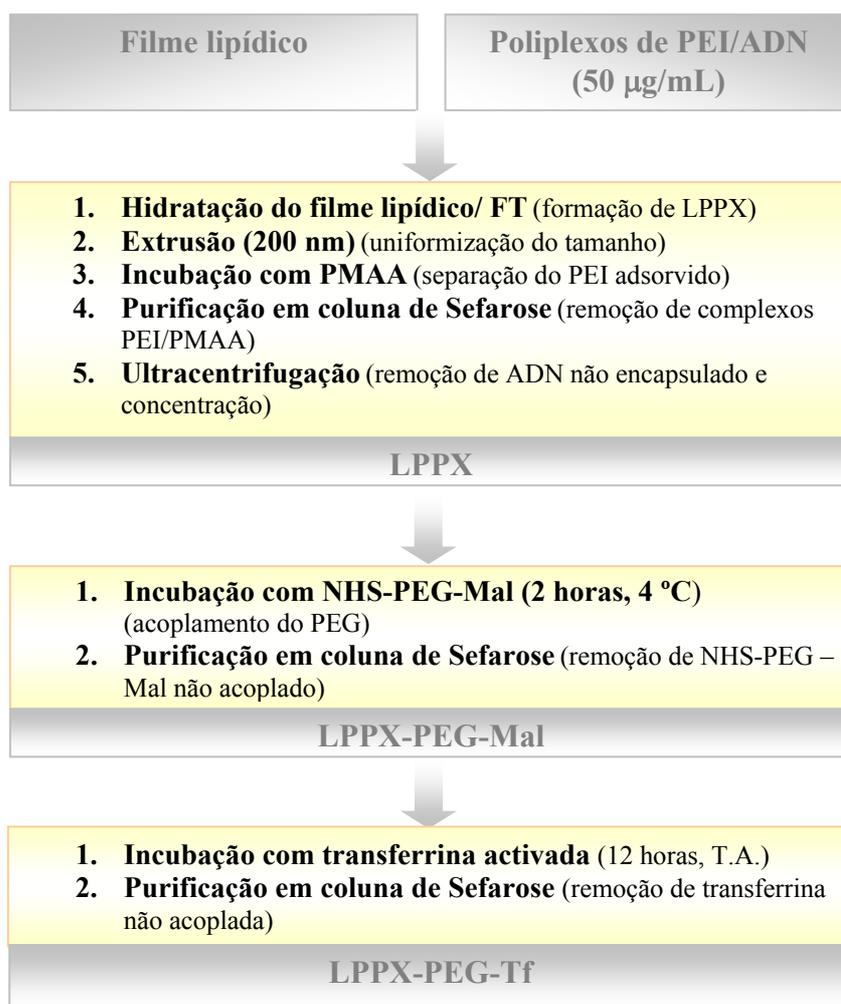
Figura 2.24- Associação celular mediada por LPPX direccionados

Os LPPX (subsecção 2.2.11.3), preparados com lípido na concentração de 9 mM e ADN na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ complexado com PEI na razão N/P de 38, marcados com Rh-PE (1 % em termos de quantidade de lípido total) e sujeitos ao tratamento com PMAA, foram incubados com células HEK-293 na concentração de 300 μM , durante 4 horas. Após esse período, as células previamente semeadas em lâminas de 8 poços, foram lavadas com PBS, fixadas com PFA a 4 % durante 15 minutos e posteriormente incubadas com solução de glicina na concentração de 0,1 M. As lâminas foram lavadas e preparadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI, e finalmente analisadas por microscopia confocal num microscópio LSM510 (Zeiss), utilizando uma objectiva com ampliação de 40 \times . (A) LPPX com PEG e sem transferrina, (B) LPPX com PEG e transferrina.

Acresce referir que a utilização do PMAA para remoção do PEI adsorvido à superfície dos lipopolíplexos, bem como o processo de ultra-centrifugação que passou a ser utilizado após a introdução deste passo no processo, não afecta o tamanho das partículas (resultados não mostrados).

Os resultados obtidos nesta secção vieram reforçar a ideia de que a eliminação total da carga positiva é muito importante para se conseguir uma interacção direccionada entre a formulação e as células alvo, e é concordante com outros dados reportados na literatura, segundo os quais as estratégias de direccionamento activo são mais facilmente aplicadas a sistemas neutros do que a sistemas de carga positiva⁴. Assim, o efeito da incorporação de um ligando específico pode ser mascarado pelo efeito não específico resultante da interacção entre o polícatião utilizado, e as moléculas de proteoglicanos da membrana celular, carregados negativamente. A prevalência de um factor sobre o outro dependerá do nível da expressão de proteoglicanos pela célula assim como da carga de superfície do complexo ADN/polícatião³¹.

Uma vez avaliadas as diferentes variáveis e parâmetros de formulação, foi finalmente possível definir um esquema global de preparação para os lipopolíplexos direccionados, que a seguir se apresenta.



2.3.5. Actividade de transfecção dos lipossomas contendo poliplexos

Apesar das características apresentadas pelos LPPX, nomeadamente o tamanho (aproximadamente 200 nm) e o perfil de associação celular, a formulação revelou-se ineficiente do ponto de vista da actividade de transfecção (Figura 2.25).

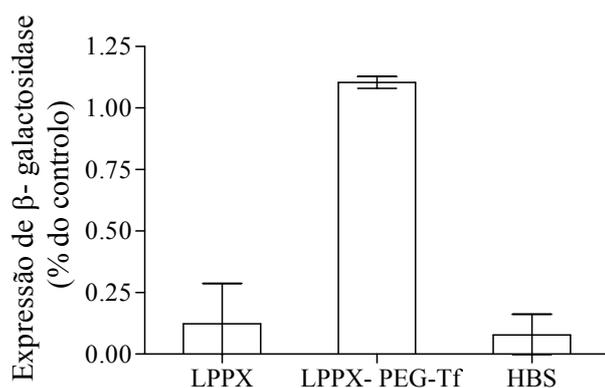


Figura 2.25- Eficiência de transfecção dos LPPX direccionados relativamente a complexos ternários

Os LPPX (subsecção 2.2.11.3), preparados com lípido na concentração de 9 mM e ADN na concentração de 50 µg/mL complexado com PEI na razão N/P de 38, foram incubados, na concentração lipídica de 300 µM, com células HEK-293 previamente semeadas em placas de 48 poços. Paralelamente, procedeu-se à incubação de complexos ternários compostos por DOTAP/CHOL/Tf/ADN, tendo-se aplicado 1 µg de ADN por poço. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído e depois de 48 horas foram lavadas e lisadas para análise da expressão da β-galactosidase. Os resultados finais encontram-se apresentados em função dos valores correspondentes à condição dos complexos ternários (controlo), à qual se atribuiu o valor de 100 %.

São várias as razões que podem potencialmente justificar os valores obtidos, e que se apresentam descritos no Capítulo 1 desta dissertação. De entre elas, a mais evidente parece ser a quantidade insuficiente de ADN entregue às células. De acordo com Kichler, no caso dos vectores sintéticos encontra-se descrito como sendo necessárias em média 10^6 cópias de plasmídeo por célula³⁶. Os estudos de transfecção realizados com lipopoliplexos direccionados foram efectuados com aproximadamente 5×10^6 cópias de plasmídeo por célula (considerando que 1 µg de ADN corresponde a $1,9 \times 10^{11}$ cópias de plasmídeo, e que as células, semeadas na densidade de 20000 por poço, foram incubadas aproximadamente com 0,5 µg de ADN por poço). No entanto, é importante lembrar que a extensão de associação celular mediada pelos lipopoliplexos direccionados é consideravelmente mais baixa do que a obtida com lipoplexos

(complexos de lipossomas catiónicos e ADN plasmídico) ou poliplexos. É de esperar que, das cópias incubadas com as células, só uma pequena fracção se associe efectivamente a estas, e que desta fracção apenas uma parte seja internalizada pelas células. Por oposição, nas experiências de transfecção mediadas por lipoplexos utilizam-se em média 10^7 cópias de plasmídeo por célula, para além do que, neste caso, os proteoglicanos de superfície desempenham uma função importantíssima na ligação e internalização dos lipoplexos³⁷, aumentando drasticamente a sua associação às células comparativamente aos níveis de associação conseguidos pelos lipopoliplexos direccionados. Assim, de modo a ultrapassar a limitação da quantidade de ADN entregue, será necessário promover a ligação e internalização dos LPPX às células, o que implicaria, por exemplo, a modulação da interacção ligando/receptor celular. Nesse sentido, o ligando deve apresentar uma elevada afinidade para o receptor, o qual por sua vez deverá ser expresso em abundância nas células alvo. Uma alternativa promissora seria optar por anticorpos ou fragmentos de anticorpo para aumentar a interacção com as células em causa.

Outro problema potencial está relacionado com o processo de internalização e reciclagem do ligando transferrina. A endocitose mediada por vesículas com revestimento de clatrina, que sucede à ligação da transferrina ao respectivo receptor, leva à formação de endossomas, os quais inicialmente são ligeiramente acidificados por bombas de prótons (pH 6)^{38,39}. Subsequentemente, os endossomas precoces evoluem para endossomas tardios (com diminuição do pH para 5), acabando por fundir com lisossomas, podendo também nos endossomas precoces ocorrer a reciclagem de receptores para a superfície da célula, através de um processo que pode ser mais ou menos lento. Uma vez que o compartimento da reciclagem é apenas ligeiramente ácido⁴⁰, e apesar de se terem utilizado duas estratégias para promover a libertação do ADN a partir do endossoma (lipossomas contendo DOPE e PEI), o pH característico das vesículas de reciclagem pode não ser suficientemente ácido para facilitar a saída do ADN destes organelos. A verificar-se esta hipótese, então, parte dos LPPX internalizados eventualmente serão reciclados para o exterior da célula.

Os resultados obtidos por Fonseca e colaboradores (resultados não publicados) demonstram que uma formulação composta por lipossomas sensíveis ao pH, conjugados com a transferrina, é eficiente na entrega de oligonucleotídeos *antisense* (AS-ODN) a células alvo. Esta abordagem apresenta maiores probabilidades de sucesso uma vez que as moléculas de AS-ODN actuam no citoplasma, ao passo que o plasmídeo de ADN tem

mais barreiras a ultrapassar até que ocorra a expressão do transgene, justificando-se deste modo a falta de sucesso de uma formulação relativamente à outra.

O trabalho desenvolvido na primeira fase deste projecto, permitiu identificar alguns dos principais problemas inerentes ao desenvolvimento de sistemas de base lipídica direccionados, para a entrega de genes. Face ao conjunto de conhecimentos adquiridos, optou-se nas fases seguintes deste trabalho por desenvolver novas formulações, com a mesma plataforma tecnológica, mas visando o direccionamento para células endoteliais activadas.

2.4. Bibliografia

- 1 Turner C *et al.* The transfection of Jurkat T-leukemic cells by use of pH-sensitive immunoliposomes. *J Liposome Res* 2002; **12**: 45-50.
- 2 Arangoa MA, Duzgunes N, Tros de Ilarduya Cj. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Ther* 2003; **10**: 5-14.
- 3 Shangguan T *et al.* A novel N-acyl phosphatidylethanolamine-containing delivery vehicle for spermine-condensed plasmid DNA. *Gene Ther* 2000; **7**: 769-783.
- 4 Bailey AL, Sullivan SMj. Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1468**: 239-252.
- 5 Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *Aaps J* 2004; **6**: e29.
- 6 Hagstrom JE *et al.* Complexes of non-cationic liposomes and histone H1 mediate efficient transfection of DNA without encapsulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1284**: 47-55.
- 7 Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos Oj. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001; **3**: 135-144.
- 8 Akinc A, Langer Rj. Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: implications for lysosomal trafficking. *Biotechnol Bioeng* 2002; **78**: 503-508.
- 9 Boussif O *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7297-7301.
- 10 Suh J. PHJaHBK. Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's *Bioorganic Chemistry* 1994; **22**: 318-327.
- 11 von Harpe A, Petersen H, Li Y, Kissel Tj. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J Control Release* 2000; **69**: 309-322.
- 12 Kunath K *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release* 2003; **89**: 113-125.

- 13 Wightman L *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2001; **3**: 362-372.
- 14 Kunath K *et al.* Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med* 2003; **5**: 588-599.
- 15 Fischer D *et al.* Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 983-992.
- 16 Shi G, Guo W, Stephenson SM, Lee RJ. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J Control Release* 2002; **80**: 309-319.
- 17 Reddy JA, Dean D, Kennedy MD, Low PSj. Optimization of folate-conjugated liposomal vectors for folate receptor-mediated gene therapy. *J Pharm Sci* 1999; **88**: 1112-1118.
- 18 Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CP. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids* 1986; **40**: 127-144.
- 19 Faneca H, Simoes S, de Lima MCj. Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1567**: 23-33.
- 20 Mold C. Effect of membrane phospholipids on activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* 1989; **143**: 1663-1668.
- 21 Moein Moghimi S *et al.* Activation of the human complement system by cholesterol-rich and PEGylated liposomes-modulation of cholesterol-rich liposome-mediated complement activation by elevated serum LDL and HDL levels. *J Liposome Res* 2006; **16**: 167-174.
- 22 da Cruz MT, Simoes S, de Lima MCj. Improving lipoplex-mediated gene transfer into C6 glioma cells and primary neurons. *Exp Neurol* 2004; **187**: 65-75.
- 23 Fonseca C *et al.* Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; **59**: 359-366.
- 24 Kircheis R *et al.* Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther* 2001; **8**: 28-40.
- 25 Kircheis R *et al.* Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 1997; **4**: 409-418.
- 26 Cristiano RJ, Roth JA. Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* 1996; **3**: 4-10.
- 27 Foster BJ, Kern JA. HER2-targeted gene transfer. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 719-727.
- 28 Goula D *et al.* Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 1998; **5**: 712-717.
- 29 Pires P *et al.* Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1418**: 71-84.
- 30 Tomlinson E, Rolland AP. Controllable gene therapy Pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems *Journal of Controlled Release* 1996; **39**: 357-372(316).
- 31 Kircheis R, Wightman L, Wagner Ej. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **53**: 341-358.
- 32 Pedroso de Lima MC *et al.* Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Curr Med Chem* 2003; **10**: 1221-1231.

-
- 33 Godbey WT, Wu KK, Mikos AGj. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999; **45**: 268-275.
- 34 Abdallah B *et al.* A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1947-1954.
- 35 Anchordoquy TJ, Girouard LG, Carpenter JF, Kroll DJ. Stability of lipid/DNA complexes during agitation and freeze-thawing. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 1046-1051.
- 36 Kichler Aj. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 2004; **6 Suppl 1**: S3-10.
- 37 Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 12349-12354.
- 38 Van Dyke RW. Acidification of lysosomes and endosomes. *Subcell Biochem* 1996; **27**: 331-360.
- 39 Presley JF *et al.* The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J Cell Biol* 1993; **122**: 1231-1241.
- 40 Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 1997; **77**: 759-803.

CAPÍTULO 3

Entrega específica de poliplexos a células
endoteliais activadas mediada por lipossomas
direccionados

3.1. Introdução

O trabalho apresentado no capítulo anterior teve como objectivo o desenvolvimento de nanotransportadores de material genético, o qual envolveu a combinação de constituintes lipídicos e poliméricos (lipopolíplexos), possibilitando simultaneamente o direccionamento específico para células alvo. Nesse trabalho utilizou-se, a título de exemplo, um sistema de direccionamento envolvendo como ligando a transferrina, e como alvo celular o respectivo receptor. Neste capítulo, e no seguimento do trabalho anterior, pretende-se avaliar se os lipopolíplexos referidos poderão ter aplicação terapêutica em patologias envolvendo células endoteliais activadas. Para tal, tendo por base os nanotransportadores desenvolvidos, utilizou-se um ligando apropriado ao novo alvo celular.

O modelo celular utilizado tem como base a activação das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) com mediadores inflamatórios, como o TNF- α , activação essa que resulta na sobre-expressão de várias glicoproteínas de superfície, nomeadamente da E-selectina¹. Estas alterações são semelhantes às verificadas em várias situações patológicas, nomeadamente em doenças inflamatórias², como a artrite reumatóide³, em patologias que decorrem com isquémia^{4,5}, ou em tumores vascularizados^{6,7}. Nestas situações verifica-se uma alteração fenotípica das células endoteliais afectadas, que passa pela sobre-expressão ou expressão *de novo*, de várias glicoproteínas de superfície. De entre as moléculas referidas, destaca-se a E-selectina pelo seu padrão de expressão completamente dependente de mediadores inflamatórios.

Assim, neste trabalho, utilizou-se como ligando um anticorpo contra a E-selectina humana, e como modelo celular, células endoteliais humanas activadas por TNF- α .

O anticorpo seleccionado como ligando (H18/7) já demonstrou eficiência de ligação específica a células endoteliais activadas, ligação que é seguida de internalização celular. Esta abordagem foi utilizada para mediar a entrega específica de lipossomas contendo fármacos^{8,9}, nunca tendo contudo sido explorada para direccionar nanotransportadores de ácidos nucleicos.

Uma das justificações apresentadas no capítulo anterior para a falta de actividade biológica da formulação direccionada para receptores da transferrina, foi atribuída aos níveis de associação celular, os quais são relativamente baixos quando comparados, por exemplo, com os observados para lipoplexos (complexos de ADN/lipossomas

catiónicos). Neste sentido, o objectivo principal do trabalho a seguir apresentado, consistiu em avaliar se a utilização de um outro ligando, neste caso um anticorpo anti-E-selectina, permite melhorar este parâmetro, promovendo a entrega eficiente de ADN às células alvo e conseqüente transfecção.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Preparação do anticorpo H18/7

O anticorpo H18/7 foi produzido e purificado por J.A. Kamps e G. Molema, pertencentes à Secção de Biologia Médica do Departamento de Patologia e de Medicina Laboratorial do Centro Médico da Universidade de Groningen, Países Baixos.

O anticorpo monoclonal H18/7 é uma imunoglobulina do tipo G2a (IgG2a) de ratinho, desenvolvida contra a E-selectina humana, tendo sido produzido pela tecnologia do hibridoma inicialmente desenvolvida pelo Dr. M. Gimbrone, Jr. (Brigham & Women's Hospital, Boston, MA). O anticorpo foi purificado a partir do meio de cultura por cromatografia de afinidade à proteína A (Protein A Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Roosendaal, The Netherlands), seguida de diálise em tampão fosfato (PBS).

3.2.2. Preparação de imunolipossomas contendo poliplexos, de imunolipossomas vazios e de misturas de imunolipossomas vazios com poliplexos

O procedimento seguido para preparação de imunolipossomas (também designados lipossomas direccionados) contendo poliplexos é similar ao apresentado na secção de “Materiais e métodos”, subsecção 2.2.11.3 do Capítulo 2, para preparação de lipopoliplexos direccionados. As principais diferenças residem na natureza do ligando utilizado, na quantidade de ligando incubado com os lipopoliplexos e no tempo de activação do ligando. Assim, neste protocolo a transferrina humana foi substituída pelo anticorpo anti-E-selectina humana (H18/7). A activação do anticorpo com 2-iminotiolano foi efectuada na mesma razão molar utilizada no Capítulo 2, mas por um período de 60 minutos e a incubação deste com os lipossomas foi efectuada partindo de uma razão inicial de 0,375 mg de anticorpo por μmol de lípido total. Os lipossomas

foram marcados com Rh-PE ou Fluor-PE, conforme indicado, na concentração de 1 ou 4 % em relação ao lípido total, respectivamente.

Os imunolipossomas vazios foram preparados de um modo idêntico à exceção do passo da hidratação, o qual foi efectuado apenas com uma solução de glicose, na ausência de políplexos. Devido à ausência de políplexos, os passos de incubação com PMAA e de ultra-centrifugação foram excluídos do processo de preparação. Os imunolipossomas vazios foram marcados com Fluor-PE na concentração de 4 % em relação ao lípido total e preparados por extrusão através de membranas com poros de diâmetro de 100, 200 ou 400 nm. Para além da formulação composta por PI/EPC/DOPE/CHOL, preparou-se igualmente uma formulação composta por EPC/DOPE/CHOL preparada na razão molar de 5/3/2.

As misturas de imunolipossomas vazios com políplexos foram preparadas por incubação de imunolipossomas e de políplexos de PEI/ADN (N/P 5) numa razão de 20 nmol de lípido total por μg de ADN.

3.2.3. Preparação de lipoplexos

Os lipossomas catiónicos, sensíveis ao pH (DOTAP/DOPE/CHEMS) (20/6/4) ou não sensíveis ao pH (DOTAP/CHOL) (1/1), foram misturados com ADN de modo a obter uma razão de carga (+/-) de 3/2 (DOTAP/ADN). Sempre que referido, os lipossomas catiónicos foram misturados com transferrina, previamente à adição do ADN, numa razão de 3,5 μg de proteína por nmol de lípido total.

Os lipossomas catiónicos compostos por EPOPC/CHOL (1-palmitoil-2-oleoilglicero-3-etilfosfocolina/colesterol) foram preparados na razão molar de 1/1 e misturados com ADN, numa razão de carga (+/-) de 3/2 (EPOPC/ADN).

3.2.4. Quantificação do colesterol

O colesterol foi quantificado de acordo com o protocolo apresentado na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

3.2.5. Quantificação do anticorpo acoplado

A quantificação do anticorpo e a respectiva eficiência de acoplamento aos lipossomas foram determinadas de acordo com o procedimento utilizado para a

quantificação da transferrina, e que se encontra descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

3.2.6. Cultura celular

As células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foram obtidas a partir do Serviço de Células Endoteliais RuG/AZG (Groningen, Países Baixos). As células isoladas foram mantidas em frascos de cultura (Corning Costar) revestidos com gelatina (Sigma) a 1 % e mantidas a 37 °C, numa atmosfera de CO₂ a 5 % e 95 % de humidade. O meio de cultura consiste em RPMI contendo Glutamax (Gibco), suplementado com soro fetal de bovino (FBS) (Sigma) não inactivado, na concentração final de 20 %, heparina (Sigma) na concentração de 18 U/mL, penicilina na concentração de 100 U/mL, estreptomicina na concentração de 100 µg/mL e ECGF (Factor de Crescimento Endotelial de bovino, Roche Applied Science) na concentração de 20 µg/mL. As experiências envolvendo estudos de direccionamento foram efectuadas em células com um máximo de 4 passagens, verificando-se sempre em paralelo a expressão da E-selectina em resposta à activação por TNF- α , conforme descrito na subsecção seguinte.

As células Hek-293 foram mantidas em cultura conforme descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

3.2.7. Expressão da E-selectina e do receptor da transferrina à superfície das células endoteliais

As células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 12 poços com uma densidade de 10000 células por poço. Após 24 horas, as células de alguns poços foram activadas com uma solução de TNF- α (Factor de Necrose Tumoral- α , Sigma) na concentração de 100 ng/mL, por um período de 4 horas. Após esse período, as células foram lavadas e destacadas com uma solução de tripsina/EDTA (Sigma). A tripsina foi imediatamente diluída com uma solução de PBS contendo FBS a 20 %, tendo as células sido centrifugadas para remoção do excesso de soro e ressuspensas em solução de PBS. As células previamente activadas e as células quiescentes (condição correspondente a células não activadas) foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-E-selectina humana conjugado com o marcador FITC (isotiocianato de fluoresceína) (R&D Systems), durante 30 minutos, a 4 °C. Após esse período, as células foram lavadas e

analisadas num citómetro de fluxo (FACSCalibur). A amostra controlo corresponde a células não incubadas com o referido anticorpo.

A detecção de receptores da transferrina foi determinada conforme referido na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2 desta dissertação.

3.2.8. Estudos de associação celular com imunolipossomas vazios e com imunolipossomas contendo poliplexos

As células foram semeadas em placas de 12 poços, com uma densidade de 10000 células por poço. Após 24 horas, as células foram activadas por incubação com TNF- α durante 1 hora, previamente à incubação com imunolipossomas marcados fluorescentemente com Fluor-PE.

Dependendo das experiências, as células foram incubadas com imunolipossomas contendo poliplexos, ou com imunolipossomas vazios, na concentração lipídica de 80, ou 80 e 160 μM , respectivamente. Esta incubação decorreu durante 4 horas, na presença de TNF- α , e seguidamente as células foram lavadas, destacadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.2.9. Estudos de transfecção

As células HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços, com uma densidade de 10000 células por poço. Após 24 horas, as células foram activadas por incubação com TNF- α durante 1 hora, previamente à incubação com imunolipossomas contendo poliplexos. Esta incubação foi efectuada com lípido total na concentração de 80 μM durante 4 horas, na presença de TNF- α , seguida da substituição do meio de cultura por meio novo. A referida concentração representa no mínimo $1,9 \times 10^6$ cópias de plasmídeo por célula. Após 48 horas, as células foram lavadas e lisadas para posterior avaliação da expressão da β -galactosidase.

As misturas de imunolipossomas vazios com poliplexos foram preparadas conforme anteriormente referido e incubadas com as células na concentração em lípido de 80 μM , correspondendo a 2 μg de ADN por poço.

Os lipoplexos contendo DOTAP/DOPE/CHEMS e DOTAP/CHOL foram preparados conforme descrito anteriormente e incubados com as células HEK-293 e HUVEC, previamente semeadas em placas de 96 poços, numa densidade de 3500 células por poço. A incubação foi efectuada durante 4 horas, com uma quantidade de

lipossomas correspondendo a 0,1 µg ADN por poço, ou seja, $5,4 \times 10^6$ plasmídeos por célula. Após 48 horas as células foram lavadas e lisadas para análise da eficiência da transfecção.

Os lipoplexos contendo EPOPC/CHOL foram utilizados em experiências em que se pretendeu estudar o efeito da hidroxiureia (HU) (Calbiochem-Novabiochem Corporation) na eficiência de transfecção. Este composto, responsável pela indução de danos no ADN, poderá ter um efeito importante sobre o promotor do citomegalovírus (pCMV), potenciando a expressão do transgene. Assim, as células HUVEC foram previamente semeadas em placas de 96 poços, numa densidade de 3500 células por poço, após o que se procedeu à incubação com HU na concentração de 1 mM, durante 12 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, e os complexos foram incubados com as células na concentração de 0,5 µg de ADN por poço, correspondendo a $2,7 \times 10^7$ cópias de plasmídeo por célula.

3.2.10. Quantificação da expressão da β-galactosidase

A expressão da β-galactosidase foi determinada conforme descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Factores condicionantes da interacção entre imunolipossomas e as células alvo

3.3.1.1. Extensão da expressão da E-selectina à superfície das células

É de esperar que a maior ou menor extensão de expressão da molécula alvo à superfície das células influencie directamente os níveis de associação celular de nano-transportadores direccionados especificamente para esses alvos.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstram que, após activação das células endoteliais com TNF-α, é possível detectar a glicoproteína E-selectina à sua superfície (Figura 3.1). A expressão desta molécula de adesão pode ser detectada em aproximadamente 75 % das células activadas, por oposição às células quiescentes, nas

quais não se detectou E-selectina (valor de p igual a 0,0042 resultante de um teste t para dados não emparelhados, tendo-se aplicado a correcção de Welch's).

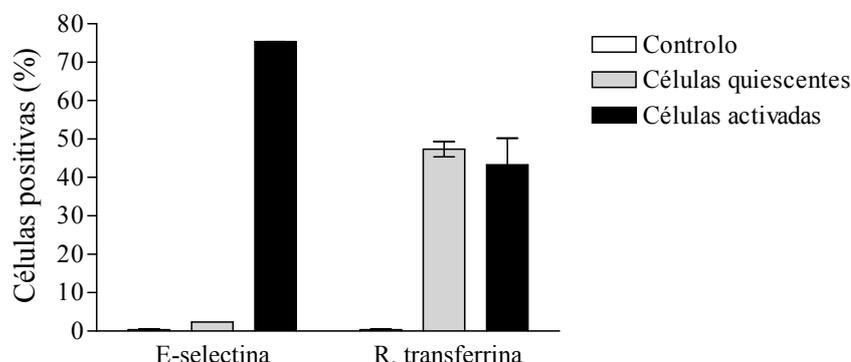


Figura 3.1- Comparação da expressão da E-selectina e da transferrina à superfície das células endoteliais

As células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 10000 células por poço. A activação das células HUVEC foi efectuada por incubação com TNF- α numa concentração de 100 ng/mL, durante 4 horas. As células previamente activadas e as células quiescentes foram incubadas com um anticorpo anti-E-selectina humana, durante 30 minutos a 4 °C, ou com transferrina humana, ambos conjugados com um composto fluorescente. Após esse período, as células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo. A condição controlo corresponde a células não incubadas com o referido anticorpo. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0042 após comparação dos valores correspondentes à expressão da E-selectina em células activadas e em células quiescentes. Dado as variâncias dos grupos analisados não poderem ser consideradas idênticas para um valor de $p < 0,05$, o teste t foi aplicado com a correcção de Welch's.

Os resultados demonstram que as células HUVEC também expressam receptores de transferrina à sua superfície (Figura 3.1). Aproximadamente 45 % das células contêm receptores da transferrina, uma percentagem inferior à detectada em células HEK-293 (aproximadamente 100 %). Contudo, e ao invés do que sucede com a E-selectina, esta expressão mantém-se constante e independente da presença do TNF- α . Esta característica da E-selectina foi uma das razões que levou à sua selecção como alvo para direccionamento de genes para células endoteliais activadas.

3.3.1.2. Eficiência de acoplamento do anticorpo H18/7

A eficiência de acoplamento do ligando aos lipossomas, entendida como a quantidade de ligando associado ao nanotransportador, também constitui um parâmetro crítico na interacção imunolipossoma/célula alvo. Para uma eficiência de acoplamento demasiado baixa, a associação dos imunolipossomas às células alvo pode ficar comprometida por diminuição da interacção lipossoma/célula. No entanto, pode

especular-se que eficiências de acoplamento demasiado elevadas também possam comprometer a associação com as células alvo, conforme referido no Capítulo 1 desta dissertação.

O acoplamento do anticorpo H18/7 resultou em imunolipossomas contendo 38 a 94 μg de anticorpo por μmol de lípido total, ou seja 0,25 a 0,65 nmol de ligando por μmol de lípido total. Estes níveis de ligação do H18/7 aos lipossomas são semelhantes aos anteriormente obtidos com a transferrina (0,52 nmol de ligando por μmol de lípido total), embora a razão molar inicial transferrina/lípido total fosse bastante mais elevada que a utilizada para H18/7.

3.3.1.3. Concentração de lípido

A determinação da concentração ideal de lípido a incubar com as células é importante no processo de optimização da associação dos imunolipossomas a células alvo. Essa concentração deve ser tal que permita a maximização da interacção entre os lipossomas e as células.

Para este efeito, foram realizadas experiências de associação celular com duas concentrações finais de lípido, 80 e 160 μM . Os resultados evidenciaram que a incubação de células HUVEC activadas com lipossomas direccionados, na concentração de 160 μM , induziu um aumento de 20 % no número de células positivas para a associação de lipossomas, em relação ao observado quando se procedeu à incubação de 80 μM em lípido (aumento de 75 % para 95 %). Contudo, também se verificou que dos 20 % de aumento, 14 % foram consequência de efeitos não específicos, restando apenas um aumento de 6 % atribuível à interacção específica (Figura 3.2).

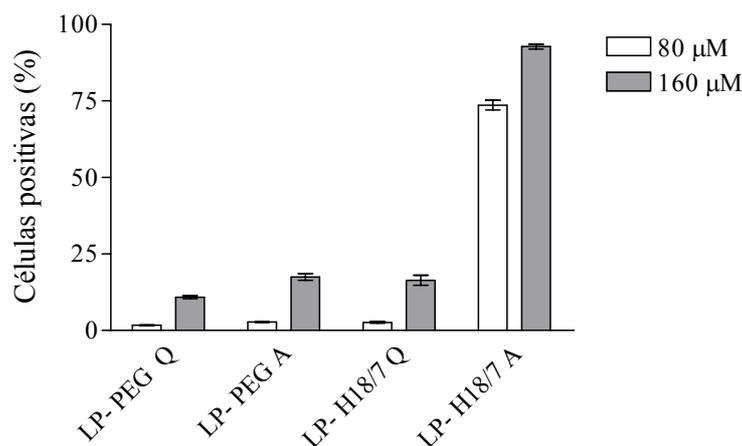


Figura 3.2- Influência da concentração lipídica na extensão da associação celular de imunolipossomas

Os imunolipossomas vazios marcados com Fluor-PE foram preparados por extrusão através de membranas com poros de diâmetro de 200 nm. De seguida, foram incubados com células HUVEC activadas com TNF- α (LP- H18/7 A), ou com células quiescentes (LP- H18/7 Q). Os lipossomas não direccionados também foram incubados com células activadas (LP- PEG A) e com células quiescentes (LP- PEG Q), nas concentrações de 80 e 160 μ M, em lípido. Os resultados apresentados foram determinados definindo o valor basal como o valor de fluorescência de células quiescentes incubadas com lipossomas não direccionados.

Em função destes resultados, pode concluir-se que para uma concentração de 80 μ M se obtém o máximo de associação celular específica, e que concentrações de lípido superiores apresentam como consequência predominante um aumento das interacções não específicas.

3.3.1.4. Tamanho dos lipossomas e composição lipídica

Com o objectivo de analisar a influência do tamanho dos imunolipossomas na extensão da associação às células, os lipossomas foram submetidos a extrusão através de membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 100, 200 ou 400 nm, durante a sua preparação.

A incubação de lipossomas não direccionados com células HUVEC (activadas ou quiescentes), assim como a incubação de lipossomas direccionados com células quiescentes, resultou em células positivas para associação de lípido, sendo essa intensidade da fluorescência igual em todas as condições referidas. Contudo, os níveis de intensidade de fluorescência supra mencionados são significativamente inferiores aos observados aquando da incubação de imunolipossomas com células activadas. Por este motivo, e à semelhança da experiência anteriormente referida, os valores de

fluorescência observados após incubação de lipossomas não direccionados com células quiescentes foram utilizados para definir o valor basal das restantes condições experimentais. O valor da intensidade da referida fluorescência basal observada é independente do tamanho dos lipossomas, uma vez que se verifica em igual extensão para lipossomas extrudidos através de membranas com poros de diâmetro de 100, de 200 ou de 400 nm. A incubação dos imunolipossomas com células HUVEC activadas resultou, tal como referido, em valores de intensidade de fluorescência superiores, tendo-se observado em média 68 % de células positivas no caso de lipossomas extrudidos através de membranas de 100 nm, 75 % para lipossomas de 200 nm e 74 % para lipossomas de 400 nm (Figura 3.3). Estes resultados sugerem que o tamanho dos imunolipossomas não parece exercer influência significativa na extensão de associação às células activadas.

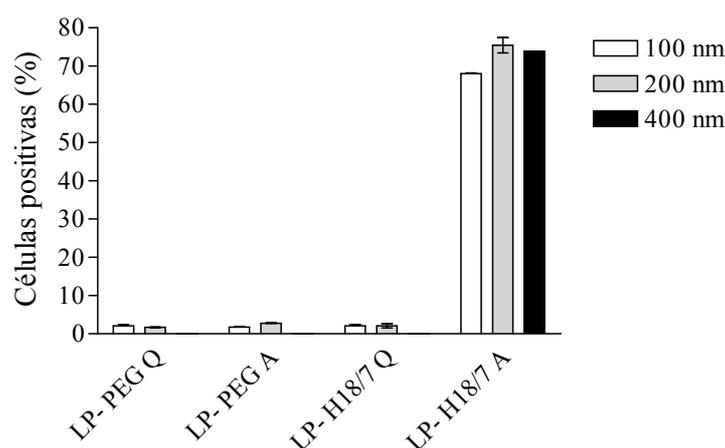


Figura 3.3- Influência do tamanho dos imunolipossomas na extensão da associação celular
Os imunolipossomas vazios marcados com Fluor-PE foram preparados por extrusão através de membranas com poros de diâmetro 100, 200 ou 400 nm. De seguida, foram incubados com células HUVEC activadas com TNF- α na concentração de 100 ng/mL (LP- H18/7 A), e com células quiescentes (LP- H18/7 Q). Os lipossomas não direccionados foram incubados com células activadas (LP- PEG A) e com células quiescentes (LP- PEG Q) nas mesmas condições. Os resultados apresentados foram determinados, definindo o valor basal como o valor de fluorescência de células quiescentes incubadas com lipossomas não direccionados.

No seu conjunto, os resultados obtidos demonstram que o direccionamento para a E-selectina foi bem sucedido, e que o aumento de tamanho dos imunolipossomas não influencia os níveis de associação celular.

Na tentativa de esclarecer a natureza da interacção não específica verificada para os lipossomas não direccionados e para os imunolipossomas incubados com células

quiescentes, avaliou-se o efeito da composição dos lipossomas na extensão de associação celular. Para tal, prepararam-se lipossomas contendo apenas lípidos neutros a pH 7,4, compostos por EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 5/3/2, e compararam-se os níveis de associação celular com os obtidos nas condições anteriores, em que se utilizaram lipossomas contendo PI, um lípido com carga negativa ao referido valor de pH. Os resultados observados demonstram que o perfil de interacção celular é idêntico ao anteriormente analisado, não decorrendo portanto qualquer efeito da carga dos lipossomas na interacção com as células (resultados não apresentados).

Tal como referido anteriormente, os resultados de associação celular obtidos estão condicionados pelos níveis de expressão de E-selectina à superfície celular, pelo que o valor de 75 % de células positivas observadas para a associação celular corresponde na realidade à totalidade das células expressando E-selectina.

3.3.1.5. Efeito da associação de poliplexos a imunolipossomas

Conforme demonstrado nos resultados apresentados no Capítulo 2 desta dissertação, a existência do polímero PEI carregado positivamente, adsorvido à superfície dos lipossomas, pode promover a interacção celular não específica destes sistemas com células em cultura.

Os resultados apresentados na Figura 3.4 demonstram que os níveis de associação celular, resultantes da incubação de imunolipossomas associados a poliplexos com células HUVEC activadas, são semelhantes aos obtidos com imunolipossomas vazios, indicando que não existem poliplexos adsorvidos à superfície dos imunolipossomas a mediar interacções não específicas.

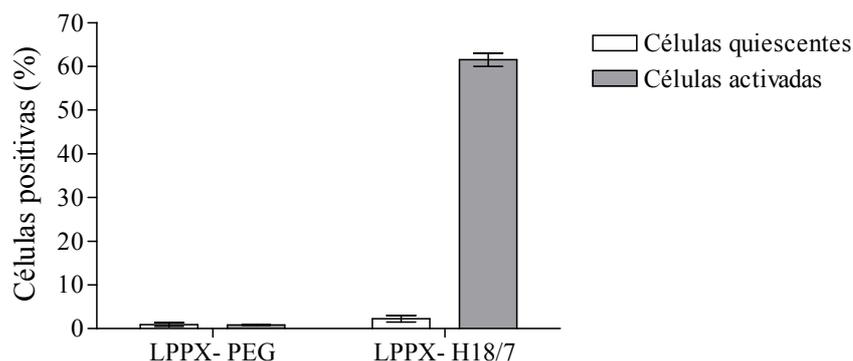


Figura 3.4- Influência da associação de poliplexos a imunolipossomas na extensão da associação celular

Os imunolipossomas marcados com Fluor-PE contendo poliplexos, foram preparados por extrusão através de membranas com poros de diâmetro de 200 nm. De seguida, os imunolipossomas foram incubados na concentração de 80 μ M com células HUVEC activadas com TNF- α na concentração de 100 ng/mL (LP- H18/7 A) e com células quiescentes (LP- H18/7 Q). Os lipossomas não direccionados foram incubados com células activadas (LP- PEG A) e com células quiescentes (LP- PEG Q) nas mesmas condições. Os resultados apresentados foram determinados definindo o valor basal como os valores de fluorescência de células quiescentes incubadas com lipossomas não direccionados. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0008 após comparação dos valores correspondentes à associação celular mediada por imunolipossomas (LPPX-H18/7) em células activadas e em células quiescentes.

Face a este conjunto de resultados, considerou-se estarem reunidas as condições para avaliar a actividade de transfecção da formulação desenvolvida.

3.3.2. Actividade de transfecção dos imunolipossomas contendo poliplexos

De modo a determinar a actividade biológica dos imunolipossomas, procedeu-se à sua incubação com células endoteliais activadas.

Apesar dos elevados valores de eficiência de associação de ADN aos lipossomas (entre 55 % a 106 %) resultantes da metodologia utilizada, a quantidade absoluta de ADN incubada com as células é relativamente baixa (aproximadamente 0,1 μ g a 0,2 μ g de ADN por poço) quando comparada com os protocolos de transfecção normalmente utilizados (1 μ g ADN por poço). Ainda assim, a quantidade de ADN incubada com as células representa no mínimo $1,9 \times 10^6$ cópias de plasmídeo por célula, a qual se encontra apenas limitada pela concentração lipídica no meio de cultura. Deste modo, e conforme referido na secção anterior, a incubação de células activadas com concentrações de lípido superiores a 80 μ M, não constitui uma mais valia no que

respeita à extensão da interacção dos lipossomas com as células alvo e, como tal, considerou-se que não haveria vantagens em utilizar concentrações de lípido superiores.

Apesar das expectativas, os resultados de transfecção demonstraram que a incubação das células com a referida formulação não resultou em níveis de transfecção mensuráveis (Figura 3.5). Os baixos valores de transfecção obtidos com a formulação controlo, composta por em DOTAP/CHOL/ADN/Tf, constituíram um indício da baixa permissividade destas células à transfecção com ADN plasmídico.

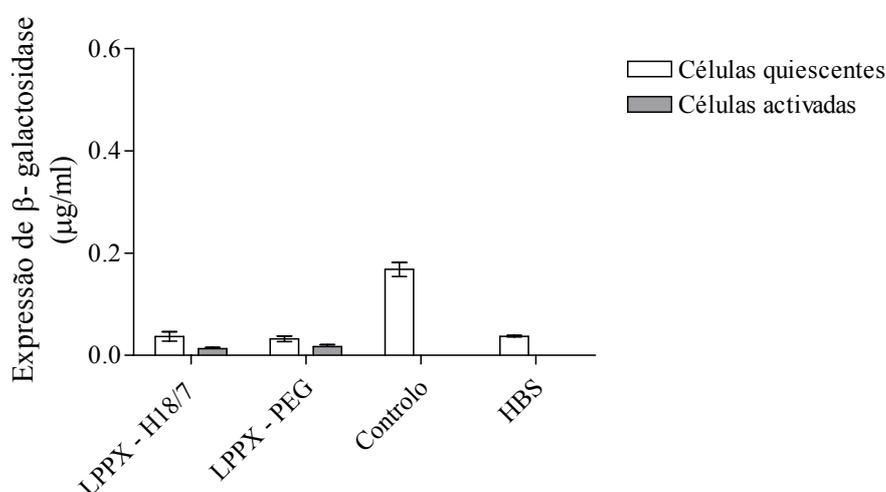


Figura 3.5- Eficiência de transfecção dos imunolipossomas

As células HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 10000 células por poço. Os imunolipossomas contendo poliplexos foram incubados com células activadas ou quiescentes (LPPX- H18/7). Experiências paralelas foram efectuadas com lipossomas não direccionados (LPPX- PEG). Como controlo positivo utilizaram-se complexos ternários de DOTAP/CHOL (1/1), contendo 3,5 µg proteína por nmol de lípido total e preparados na razão de carga (+/-) de 3/2 em DOTAP/ADN. As células HUVEC foram incubadas com imunolipossomas (0,1 µg de ADN por poço) e complexos ternários (1 µg de ADN por poço), por um período de 4 horas, e 48 horas depois a eficiência de transfecção foi avaliada por quantificação da expressão da β-galactosidase.

Face aos resultados obtidos, ponderou-se uma alteração na metodologia de preparação da formulação, tendo-se optado pela utilização de complexos preparados a partir da mistura de imunolipossomas vazios e de poliplexos, numa abordagem similar à referida por outros autores¹⁰. Deste modo, os imunolipossomas foram misturados com poliplexos de PEI/ADN (N/P 5) numa razão de 20 nmol de lípido total por µg de ADN, procedendo-se então à sua incubação com as células na concentração de 80 µM de lípido (2 µg de ADN/poço). A formulação assim preparada não demonstrou capacidade

de transfecção, quer em células endoteliais activadas, quer em células quiescentes (Figura 3.6).

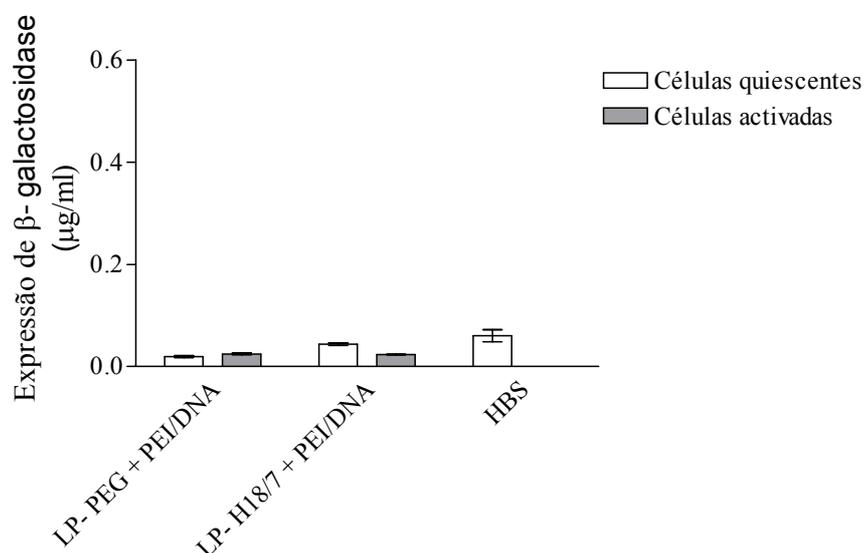


Figura 3.6- Eficiência de transfecção dos complexos de imunolipossomas

As células HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços com uma densidade de 10000 células por poço. Os complexos foram preparados por incubação de imunolipossomas vazios com poliplexos (N/P de 5) na razão de 20 nmol de lípido por µg de ADN. Os complexos resultantes foram incubados com células HUVEC activadas e quiescentes (LP-H18/7 + PEI/ADN). A correspondente formulação de lipossomas não direccionados foi preparada e incubada com as células HUVEC nas mesmas condições (LP-PEG + PEI/ADN). Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio novo e 48 horas depois a eficiência de transfecção foi avaliada por quantificação da expressão da β-galactosidase.

É importante referir que resultados obtidos por Fisher e colaboradores¹¹ demonstraram eficiência na transfecção de células endoteliais, mediada por partículas direccionadas. Nesse trabalho, os autores prepararam poliplexos compostos por ADN plasmídico complexado com polilisina numa razão molar N/P de 2. As partículas foram revestidas por um polímero (HPMA), seguido do acoplamento do ligando. De um modo geral, os resultados demonstraram elevados níveis de transfecção nas células HUVEC para partículas direccionadas com VEGF, transferrina ou FGF, sem influências marcantes da presença ou ausência de soro. Os resultados destes autores indicam assim ser possível a transfecção de células HUVEC, em determinadas condições experimentais.

Das principais diferenças entre a formulação que desenvolvemos e as partículas desenvolvidas por Fisher e colaboradores, salienta-se o polímero catiónico utilizado na complexação do ADN, a natureza do revestimento dos poliplexos, o tipo de ligando

acoplado às partículas e o tamanho destas. Os polímeros catiónicos utilizados para complexação do ADN (PEI ou polilisina) têm uma função semelhante e são ambos caracterizados pela elevada densidade de cargas positivas. Contudo, a razão azoto/fosfato utilizada neste trabalho (N/P de 38) foi muito mais elevada do que a utilizada pelos autores (N/P de 2). A razão N/P é um parâmetro importante, uma vez que pode condicionar a transcrição dos ácidos nucleicos complexados, encontrando-se descrito que para razões elevadas de carga positiva/carga negativa, o ADN terá problemas em dissociar-se do polímero, impedindo a sua correcta transcrição, conforme referido por Schaffer e colaboradores¹². No entanto, os resultados por nós obtidos (Capítulo 2) demonstraram que esta razão molar é bastante eficiente na transfecção de células HEK-293, e que portanto, nestas condições, a elevada razão N/P não se revelou problemática.

No que respeita ao polímero utilizado para o revestimento das partículas, este apresenta uma natureza completamente diferente dos lipossomas por nós utilizados, dificultando a comparação deste parâmetro em termos do seu efeito na eficiência de transfecção.

Dos resultados reportados na literatura, podemos excluir o ligando como factor limitativo da transfecção, uma vez que, como referido na secção “Introdução” deste capítulo, a ligação do anticorpo H18/7 à E-selectina induz a internalização celular dos lipossomas.

Finalmente, as partículas preparadas por Fisher e colaboradores apresentam um tamanho médio de 60 nm, enquanto que as partículas apresentadas neste trabalho apresentam um tamanho três vezes superior. Apesar de dados reportados na literatura não indicarem limitações à internalização celular mediada por receptores de partículas de 200 nm, permanece por esclarecer se, neste tipo particular de células, este tamanho constitui um factor limitativo à sua internalização.

Para além das razões expostas, não é de excluir que as diferenças verificadas entre os nossos resultados e os resultados publicados referidos se devam à utilização de procedimentos técnicos diferentes, que poderão influenciar os valores obtidos. Neste contexto, é de salientar ainda a escassez de publicações referindo a transfecção bem sucedida de culturas primárias de células endoteliais usando vectores não virais, apesar do interesse clínico subjacente à aplicação da terapia génica em células endoteliais vasculares.

No seu conjunto, os resultados apresentados deixam em aberto se a ineficiência de transfecção observada é consequência da ineficiente entrega de ADN às células ou da falta de permissividade das células HUVEC à transfecção envolvendo ADN plasmídico.

3.3.3. Permissividade das células endoteliais à transfecção mediada por lipoplexos

Com o objectivo de avaliar se as células endoteliais seriam permissivas à transfecção mediada por plasmídeos, foram efectuadas experiências sistemáticas de transfecção recorrendo a vários tipos de lipossomas catiónicos. A ocorrência de transfecção nestas condições será um indicador da permissividade destas células e, simultaneamente, da ineficiência dos imunolipossomas em mediar uma entrega adequada de ADN a estas. Por outro lado, a não ocorrência de transfecção poderá sugerir a falta de permissividade das células como factor condicionante dos baixos níveis de transfecção observados.

Assim, prepararam-se lipoplexos a partir de lipossomas catiónicos constituídos por DOTAP/CHOL e de lipossomas catiónicos sensíveis ao pH, compostos por DOTAP/DOPE/CHEMS, tendo-se testado também a presença do ligando transferrina na preparação dos lipoplexos. As células HUVEC foram incubadas com ADN numa quantidade de 0,1 µg por poço, o que corresponde a $5,4 \times 10^6$ plasmídeos por célula. Esta razão é semelhante à utilizada nas experiências de transfecção utilizando imunolipossomas contendo poliplexos. Em paralelo, realizaram-se estudos utilizando-se células HEK-293 para comprovar a eficiência dos lipoplexos preparados.

Os resultados obtidos em células HUVEC demonstram que os lipossomas catiónicos, conhecidos pela sua eficiência de transfecção, não induziram expressão mensurável do transgene (Figura 3.7). Em contrapartida, os níveis de transfecção obtidos em células HEK-293 são muito elevados, excluindo assim problemas relacionados com a eficiência das formulações catiónicas.

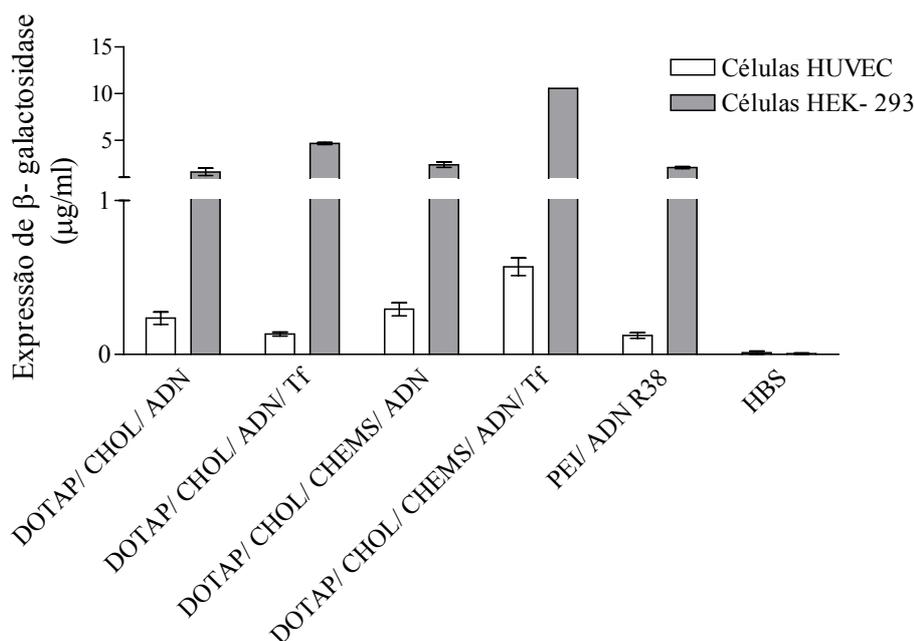


Figura 3.7- Eficiência de transfecção em células HUVEC e HEK- 293 mediada por lipoplexos

As células HUVEC e HEK- 293 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 3500 células por poço. Após 24 horas, foram incubadas com lipoplexos preparados a partir de lipossomas catiónicos de DOTAP/CHOL (1/1) (DOTAP/CHOL/ADN), ou com complexos ternários compostos por DOTAP/CHOL (1/1), e transferrina (3,5 µg transferrina por nmol de lípido total) (DOTAP/CHOL/ADN/Tf). As células foram também incubadas com lipoplexos, preparados a partir de lipossomas catiónicos sensíveis ao pH constituídos por DOTAP/DOPE/CHEMS (20/6/4) (DOTAP/DOPE/CHEMS/ADN), ou complexos ternários preparados a partir de lipossomas de DOTAP/DOPE/CHEMS (20/6/4), contendo transferrina (3,5 µg transferrina por nmol de lípido total) (DOTAP/DOPE/CHEMS/ADN/Tf). A mistura de ADN com os lipossomas catiónicos foi realizada de modo a que a razão de carga final fosse 3/2. Adicionalmente, testou-se a eficiência de poliplexos constituídos por PEI/ADN preparados na razão molar N/P de 38. As células foram incubadas com os diferentes lipoplexos, correspondendo a uma quantidade de ADN de 0,1 µg por poço, por um período de 4 horas, e 48 horas depois a eficiência de transfecção foi avaliada por quantificação da expressão da β-galactosidase.

Na tentativa de identificar as causas da aparente falta de permissividade das células HUVEC à transfecção mediada por vectores não virais, procurou-se esclarecer se a ausência de transfecção resulta (i) de uma ineficiente entrega de material genético e/ou (ii) de limitações celulares para processar o material genético internalizado. Relativamente à primeira hipótese, importa referir os estudos de Fisher e colaboradores¹¹, os quais reportam a utilização de uma formulação de DOTAP/ADN (razão de carga positiva/negativa de 2,3) que resultou na transfecção das células HUVEC, mesmo na presença de soro (10 % de FBS). Contudo, experiências paralelas realizadas na ausência de soro revelam um aumento da transfecção em 75 vezes,

indicando o papel relevante do soro na inibição da transfecção mediada pelos lipoplexos. Na tentativa de esclarecer as discrepâncias entre os resultados obtidos por estes autores e aqueles aqui apresentados, é importante salientar que a utilização de 20 % de soro nas nossas experiências pode ter inviabilizado a transfecção, uma vez que, conforme referido, este é um factor importante na transfecção mediada por lipoplexos, ao contrário do verificado para lipossomas direccionados¹¹.

Relativamente à utilização de poliplexos de PEI/ADN (N/P 38), uma formulação anteriormente utilizada como controlo positivo em experiências de transfecção em células HEK-293, a ineficiência da transfecção observada (Figura 3.7) contraria os resultados obtidos por Zaric e colaboradores¹³, uma vez que estes autores demonstraram eficiência de transfecção em células endoteliais, com poliplexos de PEI/ADN preparados numa razão de 5/1, utilizando, no entanto, PEI linear de 22 KDa. De acordo com estes investigadores, a transfecção com este polímero foi observada após incubação na presença de soro a 2 % e a 30 %, excluindo este parâmetro como condicionante das diferenças observadas entre os dois trabalhos. A razão subjacente à discrepância de resultados obtidos pode residir nas diferenças de peso molecular assim como no grau de ramificação das moléculas de PEI, e ainda na razão molar N/P utilizada nas duas aproximações experimentais¹⁴⁻¹⁶.

Por outro lado, o trabalho realizado por Kaiser e colaboradores¹⁷ consistiu na avaliação da eficiência de transfecção de vários agentes comerciais em células HUVEC. Os autores referem, à semelhança do que temos vindo a demonstrar, a dificuldade de transfectar de um modo eficiente células endoteliais primárias. Apesar de tudo, demonstram transfecção numa das condições envolvendo o agente de transfecção pF_x-7, ainda que associada a elevados níveis de citotoxicidade.

Relativamente à segunda hipótese apresentada, segundo a qual seriam limitações celulares para processar o material genético internalizado a condicionar a eficiência de transfecção de células HUVEC, procedeu-se à avaliação da eficiência de transfecção de lipoplexos na presença de hidroxureia (HU). Neste procedimento considerou-se que promotores fortes, como o promotor do citomegalovírus (pCMV), apresentam elementos de ligação para factores de transcrição, tais como o AMP cíclico e o NF- κ B¹⁸, os quais podem potencialmente promover a activação do promotor, e consequentemente a transfecção. Assim, especulou-se que a incubação de células endoteliais com hidroxureia, um composto conhecido por induzir danos no ADN das células¹⁹, pudesse resultar na activação dos factores de transcrição apropriados,

estimulando desse modo o processo da transfecção. Nesse contexto, após incubação das células com o referido composto, estas foram incubadas com lipoplexos preparados pela associação de ADN a lipossomas de EPOPC/CHOL. Contudo, nestas condições, não se verificou qualquer benefício na eficiência de transfecção (Figura 3.8), sugerindo que a activação das vias de reparação do ADN induzida pela HU não interferem na transfecção mediada por este tipo de vector plasmídico, nas condições descritas.

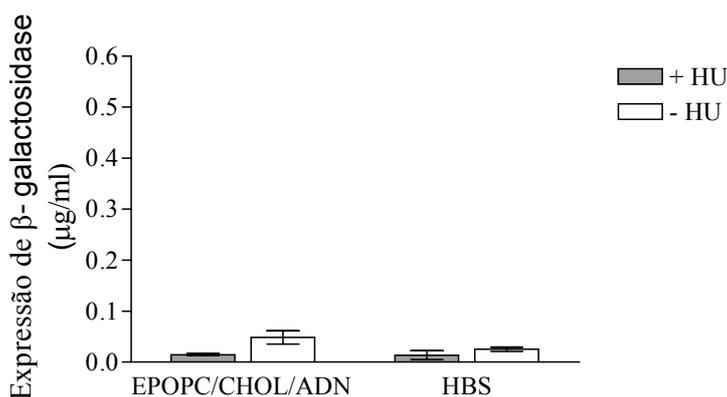


Figura 3.8- Eficiência de transfecção em células HUVEC mediada por lipoplexos na presença de hidroxureia

Células HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 3500 células por poço, e 12 horas depois incubadas com hidroxureia na concentração de 1 mM por um período de 12 horas. Após esse período, as células foram incubadas com lipoplexos (0,5 µg de ADN por poço) preparados a partir de lipossomas catiónicos (EPOPC/CHOL (1/1)) (EPOPC/CHOL/ADN), na razão de carga de 3/2. A incubação foi realizada por um período de 4 horas e a eficiência de transfecção foi avaliada 48 horas depois por quantificação da expressão da β-galactosidase.

No seu conjunto, os resultados obtidos sugerem que as células endoteliais não são permissivas à transfecção por plasmídeos de ADN. Como tal, à luz dos nossos resultados, a aplicação de protocolos de terapia génica às células endoteliais mediada por vectores não virais, encontra-se limitada pelos baixos valores de expressão do transgene, ou, quando a transfecção é bem sucedida, pelos elevados valores de citotoxicidade verificados, tal como observado por outros autores¹⁷.

Atendendo à importância estratégica da entrega de transgenes a células endoteliais como forma de implementar novas abordagens terapêuticas para um número alargado de patologias, e face às limitações reportadas neste capítulo relativamente ao uso de vectores não virais, urge encontrar soluções alternativas. A alternativa considerada, implica tentar conjugar as vantagens reconhecidas simultaneamente aos lipossomas direccionados desenvolvidos neste trabalho, com inequívoca especificidade

de interacção com células endoteliais activadas, e aos vectores virais, os quais apresentam elevada eficiência de transdução em vários tipos celulares.

3.4. Bibliografia

- 1 Ogawara K *et al.* A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 433-443.
- 2 Koning GA, Schiffelers RM, Storm GJ. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. *Endothelium* 2002; **9**: 161-171.
- 3 Middleton J *et al.* Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: 60-72.
- 4 Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; **66**: 232-245.
- 5 Zund G *et al.* Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 7075-7080.
- 6 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249-257.
- 7 Bhaskar V *et al.* E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 6387-6394.
- 8 Spragg DD *et al.* Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 8795-8800.
- 9 Everts M *et al.* In vitro cellular handling and in vivo targeting of E-selectin-directed immunoconjugates and immunoliposomes used for drug delivery to inflamed endothelium. *Pharm Res* 2003; **20**: 64-72.
- 10 Turner C *et al.* The transfection of Jurkat T-leukemic cells by use of pH-sensitive immunoliposomes. *J Liposome Res* 2002; **12**: 45-50.
- 11 Fisher KD *et al.* A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther* 2000; **7**: 1337-1343.
- 12 Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DAJ. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000; **67**: 598-606.
- 13 Zaric V *et al.* Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med* 2004; **6**: 176-184.
- 14 Wightman L *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2001; **3**: 362-372.
- 15 Lemkine GF, Demeneix BAJ. Polyethylenimines for in vivo gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2001; **3**: 178-182.
- 16 Kunath K *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release* 2003; **89**: 113-125.
- 17 Kaiser S, Toborek Mj. Liposome-mediated high-efficiency transfection of human endothelial cells. *J Vasc Res* 2001; **38**: 133-143.

- 18 Wehl C *et al.* Gene therapy for cerebrovascular disease. *Neurosurgery* 1999; **44**: 239-252; discussion 253.
- 19 de Lima PD *et al.* Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. *Genet Mol Res* 2003; **2**: 328-333.

CAPÍTULO 4

Entrega de vírus adeno-associados a células
endoteliais activadas mediada por lipossomas
direccionados

4.1. Introdução

Os resultados descritos nos Capítulos 2 e 3 desta dissertação foram cruciais, uma vez que forneceram pistas sobre dois parâmetros condicionantes da eficiência de transfecção dos sistemas desenvolvidos. Assim, os resultados reportados no Capítulo 2 indicaram que, apesar de se terem obtido elevados níveis de associação de poliplexos a lipossomas, a baixa extensão de associação celular observada com os lipopoliplexos (LPPX) direccionados pode ter limitado a quantidade de ADN entregue às células alvo, comprometendo deste modo a expressão do transgene. Adicionalmente, à luz dos resultados descritos no Capítulo 3, a aplicação de protocolos de terapia génica em células endoteliais, mediada por vectores não virais, parece encontrar-se limitada pela falta de permissividade destas células face à transfecção mediada por plasmídeos. De um modo geral, pode considerar-se que a permissividade celular depende de dois conjuntos de factores. Um desses conjuntos engloba todas as condicionantes que levam ao impedimento da entrada do transportador do transgene nas células alvo, enquanto o outro se relaciona com as limitações que podem ocorrer no processamento do transgene após entrada deste na célula. Contudo, a elevada extensão de associação celular mediada pelos imunolipossomas descritos no Capítulo 3, juntamente com a análise de vários sistemas catiónicos considerados de um modo geral eficientes na entrega de plasmídeo às células, sugere que a falta de permissividade observada nas células endoteliais seja consequência do processamento do transgene após entrada deste na célula alvo.

Na tentativa de ultrapassar esta limitação, considerou-se que a causa da ineficiência de expressão do transgene pudesse residir também na natureza do vector transportado pelos lipossomas, e conseqüentemente entregue às células. Nesse sentido, optou-se por substituir os vectores plasmídicos por vectores virais, reconhecidos pela elevada eficiência em transduzir uma grande variedade de células. A hipótese colocada neste trabalho foi a de que a encapsulação de vectores virais adeno-associados em lipossomas induziria elevados níveis de expressão do transgene nas células, como consequência da eficiência dos vectores virais e, simultaneamente, que essa expressão ocorreria especificamente em células alvo, como consequência da entrega dos vectores virais mediada pelos lipossomas direccionados.

Dos vectores virais disponíveis, a escolha recaiu sobre os vectores virais adeno-associados (rAAV). Estes vectores, cuja utilização em protocolos envolvendo terapia génica é cada vez mais frequente, têm vindo a demonstrar eficiência de transdução em

vários órgãos, como por exemplo em pulmão¹, músculo²⁻⁵, cérebro⁶, espinal-medula^{7,8,9} e fígado¹⁰.

Os vírus adeno-associados (AAV), representados na Figura 4.1, não apresentam invólucro, e são caracterizados por possuírem uma cápside icosaédrica, no interior da qual se encontra o genoma constituído por uma molécula de ADN de cadeia simples¹¹.

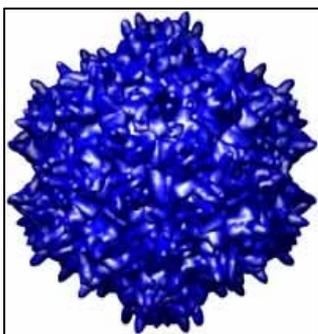


Figura 4.1- Representação de um vírus adeno-associado

Adaptado de imagem do site da Internet <http://researchnews.osu.edu/archive/newvect.htm>

Estes vírus apresentam um ciclo de vida bifásico, verificando-se numa primeira fase a entrada na célula hospedeira e no respectivo núcleo, e a posterior transformação do ADN viral de cadeia simples em cadeia dupla. Na ausência de vírus com funções auxiliares, o ADN dos AAV é integrado no genoma do hospedeiro e assim se mantém numa forma latente, até que se reúnam as condições necessárias para que o ciclo de replicação viral se complete. A segunda fase do ciclo é desencadeada pela presença de um vírus adjuvante, verificando-se um processo de replicação activo do genoma do AAV, durante o qual as proteínas da cápside e o ADN são empacadas, ainda dentro do núcleo da célula¹². Estes vírus não possuem capacidade lítica, e a sua saída das células infectadas depende como tal da actividade lítica do vírus adjuvante¹¹. Os AAV estão assim classificados num género de nome *Dependovirus* devido à dependência que apresentam em relação à infecção por parte de outros vírus, para que o ciclo produtivo se complete¹¹. Este género está incluído na família *Parvoviridae*, a qual é caracterizada por vírus de pequeno tamanho, apresentando, no caso específico dos AAV, um diâmetro compreendido entre 18 e 25 nm. As funções auxiliares acima referidas podem ser desempenhadas por vários tipos de vírus, de entre os quais se salientam os adenovírus, os vírus *Herpes simplex*^{13,14} e também os citomegalovírus¹⁵. Foram já isolados 11 serotipos de AAV¹⁶⁻¹⁹, todos eles apresentando uma estrutura semelhante, assim como tamanho e organização de genoma, mais concretamente, estrutura e localização de

ORFs (*open reading frames*), promotores, intrões e locais de poliadenilação¹¹. De todos os AAV isolados, o serotipo 2 é sem dúvida o mais estudado. O seu genoma apresenta um tamanho de 4,7 Kb e contém 2 ORFs, que codificam quatro proteínas reguladoras (proteínas Rep), e três proteínas estruturais (proteínas Cap)^{20,21}. O genoma dos AAV encontra-se flanqueado por 2 ITR (*inverted terminal repeats*), que apresentam uma estrutura em *hairpin*, resultante do emparelhamento de bases. As sequências reguladoras contidas nas ITRs, requeridas pelos vírus para completar o seu ciclo de vida, incluem a origem de replicação do genoma, o local de resolução terminal e os sinais de empacamento e de integração. As duas proteínas Rep mais importantes, Rep78 e Rep68 estão envolvidas na excisão do genoma viral, na replicação e integração²² e também na regulação da expressão dos genes virais a partir dos promotores^{23,24}. As proteínas Rep52 e Rep40 estão envolvidas no empacamento do ADN de cadeia simples (ssADN) replicado²⁵. A ORF Cap é iniciada pelo promotor p40 e codifica as 3 proteínas estruturais da cápside, VP1, VP2 e VP3¹¹.

Os AAV apresentam a propriedade única de integrar num local específico do genoma humano, o que tem sido descrito extensivamente para os AAV₂^{26,27}. Contudo a manipulação genética aplicada aos vectores virais conduz à perda dessa propensão. Na preparação dos vários serotipos dos vectores virais adeno-associados mantêm-se sempre as sequências ITR dos AAV₂ alterando apenas as cápsides, de acordo com o serotipo que se pretende preparar¹¹. Considera-se que quando os rAAV são utilizados com a função de transduzir células, uma parte significativa da expressão resulta de genomas virais extracromossómicos que persistem como epissomas lineares ou circulares de cadeia dupla^{28,29}, ocorrendo frequentemente a formação de concatâmeros de elevado peso molecular, resultantes de eventos de recombinação intra e intermolecular entre vários genomas virais^{30,31}.

Tal como referido anteriormente, estes vectores são extremamente eficientes a transduzir vários tipos de células, eficiência esta que resultou do aperfeiçoamento a que os vírus têm sido sujeitos ao longo de milhares de anos. No entanto, apesar das vantagens de eficiência associadas a estes vectores, o seu tropismo celular varia, entre outros factores, em função dos receptores celulares com os quais interagem. Os proteoglicanos de sulfato de heparano são os principais receptores dos AAV₂, enquanto que o receptor-1 do FGF (factor de crescimento de fibroblastos) e as integrinas $\alpha\beta 5$ constituem os co-receptores³². É importante salientar contudo, que diferentes serotipos parecem utilizar receptores celulares diferentes.

No sentido de promover a interacção eficiente deste tipo de vectores virais com determinado tipo de células alvo têm sido testadas duas estratégias distintas: uma implica a utilização de compostos bi-específicos, ou seja, compostos que apresentam especificidade tanto para as proteínas das cápsides dos AAV, como para os receptores celulares para os quais se pretende fazer o direccionamento³³, enquanto que a outra estratégia implica a manipulação genética das proteínas da cápside viral³⁴. A aplicação desta última abordagem, realizada com o objectivo de promover o tropismo de AAV para células endoteliais, veio levantar ainda mais controvérsia sobre os mecanismos subjacentes à transdução destas células pelos vectores virais adeno-associados. Assim, e apesar de ser bastante consensual que a capacidade de transdução mediada pelos rAAV em células endoteliais é baixa ou praticamente nula^{32,35}, a manipulação genética das proteínas da cápside viral permitiu a selecção de um vector mutado que, contrariamente ao vector original, evidenciou eficiência na transdução de células endoteliais³². Este resultado indica que a ineficiência destes vectores em células endoteliais poderá ocorrer como consequência de limitações na sua internalização celular. Com base nestes resultados, considerou-se que o plano de trabalho adoptado neste capítulo, que inclui a encapsulação de rAAV em lipossomas direccionados, poderia permitir ultrapassar a hipotética barreira da sua entrada em células endoteliais.

Para além das vantagens referidas, a encapsulação dos rAAV em lipossomas poderá proporcionar a administração destes vectores a indivíduos que apresentem anticorpos específicos desenvolvidos contra o vírus. Estima-se que 70 a 80 % da população já foi exposta a um evento infeccioso por AAV³⁶, apesar de não existirem efeitos clínicos graves associados com a infecção em humanos, o que se deve em parte à fraca resposta imunitária inata que desencadeiam. Paralelamente, a administração de AAV recombinantes, não obstante a remoção das sequências virais do genoma, também induz uma resposta imunitária que envolve a produção de anticorpos contra as proteínas da cápside, impedindo a expressão do transgene após readministração³⁷. Assim, e apesar dos rAAV induzirem uma expressão do transgene a longo prazo, a qual é compatível com uma administração única dos vectores, os dados apresentados sugerem que a preexistência de anticorpos poderá constituir uma barreira importante logo na primeira administração. Le e colaboradores³⁸ demonstraram que a conjugação de moléculas de PEG às proteínas da cápside de AAV recombinantes é um procedimento eficiente na protecção dos vectores virais contra anticorpos preexistentes, quer *in vivo* quer *in vitro*,

para além de permitir protegê-los contra a neutralização mediada pelas proteínas do soro.

No seu conjunto, o trabalho apresentado neste capítulo teve como principal objectivo avaliar se a encapsulação de rAAV em lipossomas direccionados resulta na transdução específica em células alvo. No caso específico das células endoteliais, esta abordagem permitirá fornecer novos dados no sentido de determinar se a limitação da transdução relativamente aos rAAV se deve ao impedimento destes em entrar nas células, ou se é consequência de limitações que se manifestam após estes serem internalizados.

Para avaliar estas hipóteses, numa fase inicial optou-se pela encapsulação de rAAV em lipossomas direccionados para receptores de transferrina e subsequente avaliação da eficiência de transdução utilizando células HEK-293. São três as razões que justificam esta opção. A primeira razão prende-se com a utilização de um tipo celular onde os rAAV são eficientes (HEK-293) para posteriormente comparar os resultados observados com os obtidos em culturas primárias de células endoteliais onde estes têm demonstrado ser ineficientes (HUVEC). Deste modo, através desta comparação, é potencialmente mais fácil apurar mecanismos limitativos da eficiência da formulação, assim como esclarecer mecanismos subjacentes à transdução mediada por rAAV. A segunda razão prende-se com possíveis optimizações que tenham de ser realizadas, as quais, por uma questão de gestão de recursos, serão preferencialmente aplicadas no modelo celular utilizando as células HEK-293. Finalmente, qualquer resultado positivo obtido com este modelo permitirá a extrapolação para terapia génica aplicada a cancro, uma vez que as células tumorais, à semelhança das células HEK-293, apresentam normalmente elevada expressão de receptores de transferrina.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Quantificação de rAAV

No sentido de preparar as amostras para a quantificação do ADN viral pela técnica de PCR quantitativo, os rAAV encapsulados em lipossomas ou livres (não encapsulados em lipossomas), foram incubados com ADNase para destruir moléculas de ADN contaminantes. De seguida, procedeu-se à incubação com uma solução de

proteínase K preparada em tampão de lise, com objectivo de destruir os lipossomas e a cápside proteica dos rAAV. Este procedimento permitiu a exposição do genoma viral, o qual fica assim disponível para amplificação pela enzima polimerase. No processo de amplificação utilizaram-se *primers* e uma sonda FAM (N-(3-fluorantill)maleimida), ambos desenhados para a região CMV do genoma viral, os quais foram adquiridos da Sigma Genosys, juntamente com o kit JumpStart *Taq* ReadyMix contendo a polimerase e os nucleótidos, tendo as reacções de PCR sido efectuadas num aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Em teoria, existe uma desvantagem associada à utilização do protocolo associado à sonda FAM para quantificação de genomas de rAAV encapsulados em lipossomas marcados com Rh-PE, já que esta sonda e a rodamina podem apresentar espectros de fluorescência sobreponíveis, dificultando a utilização deste método para quantificação do ADN viral. Com o objectivo de testar a influência da Rh-PE no processo de quantificação envolvendo a sonda FAM, os genomas de rAAV foram quantificados na presença de lipossomas marcados ou não com Rh-PE. Os resultados obtidos demonstram a ausência de qualquer influência da presença de lipossomas marcados com Rh-PE na quantificação de genomas virais, o que é reflectido pela sobreposição das duas curvas padrão obtidas na presença de lipossomas preparados com ou sem Rh-PE (Figura 4.2).

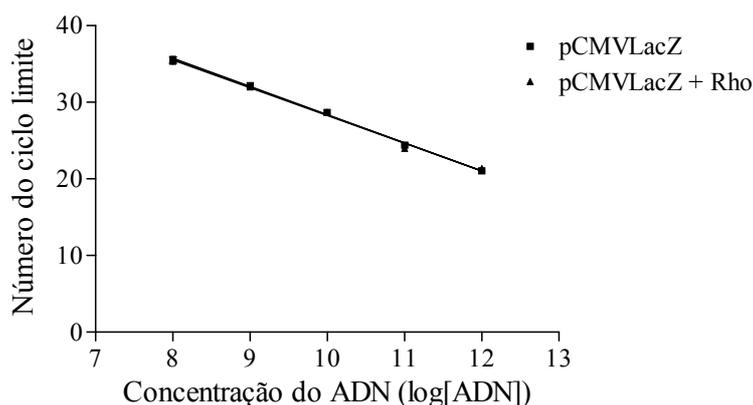


Figura 4.2- Quantificação de ADN viral na presença de lipossomas preparados com e sem Rh-PE

A influência do EDTA na reacção de PCR também foi testada, uma vez que é conhecido que elevadas concentrações deste composto são responsáveis pela inibição da actividade enzimática da polimerase. Deste modo, obtiveram-se duas curvas padrão

idênticas, uma na presença e outra na ausência de EDTA, em concentração idêntica à utilizada na preparação de lipossomas. Os resultados apresentados na Figura 4.3 demonstram que o EDTA, na referida concentração, não interfere com o processo de quantificação dos genomas.

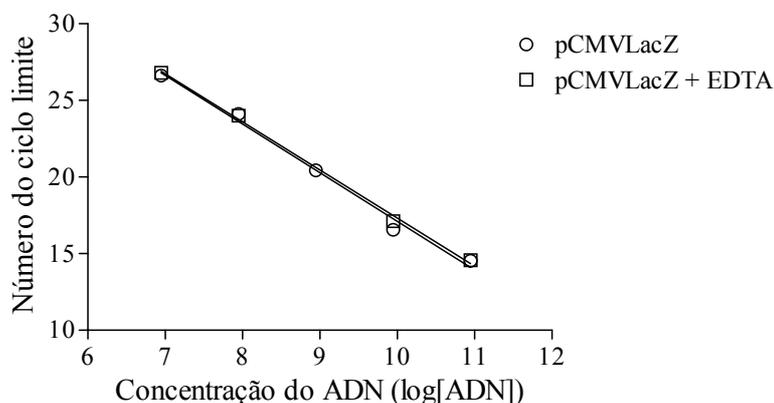


Figura 4.3- Quantificação de ADN plasmídico na presença e ausência de EDTA

4.2.2. Métodos de purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAAV

Após encapsulação de rAAV em lipossomas, é essencial remover os vectores não encapsulados. Para tal, o primeiro método avaliado foi a cromatografia de exclusão molecular, utilizada nos Capítulos 2 e 3 para purificação de lipopolíplexos. No caso particular da determinação da eficiência desta técnica na purificação de lipossomas (separação de lipossomas encapsulando rAAV de rAAV livres), procedeu-se à eluição de uma solução contendo rAAV numa concentração de 10^{11} genomas de AAV/mL (0,5 mL) através de uma coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com PBS. As fracções eluídas foram sujeitas a quantificação pela técnica de PCR referida.

Adicionalmente, avaliou-se a eficiência da cromatografia de afinidade, utilizando colunas contendo heparina. A heparina é um glicosaminoglicano que se encontra normalmente ligado a um núcleo proteico formando os proteoglicanos, à semelhança do sulfato de heparano, um outro glicosaminoglicano que conforme referido na secção “Introdução” deste capítulo constitui um dos receptores da superfície celular para ligação de AAVs³⁹. Este princípio tem sido utilizado na purificação dos rAAV a partir dos extractos celulares onde são produzidos. A eluição de extractos contendo AAV, através de colunas de heparina, utilizando soluções com uma baixa força iónica,

permite a interacção do AAV com a heparina, interacção esta que deixa de ocorrer na presença de soluções com forças iónicas mais elevadas. Assim, neste trabalho, o protocolo apresentado por Zolotokhin e colaboradores⁴⁰ foi adaptado à purificação de lipossomas. A coluna (Sigma) foi empacada com Heparina Tipo I (Sigma) e equilibrada com PBS contendo cloreto de sódio na concentração de 0,1 M. A eluição dos lipossomas foi realizada com o tampão referido, e a subsequente eluição dos rAAV não encapsulados, ligados à heparina, foi efectuada com PBS contendo cloreto de sódio na concentração de 1 M.

A purificação dos lipossomas foi igualmente testada pela técnica envolvendo separação por gradiente de Ficoll. Para tal, misturou-se uma solução de Ficoll 400 (Sigma) a 30 % (1,5 mL) com a solução contendo os lipossomas a purificar (0,5 mL), de modo a obter uma solução de Ficoll com a concentração final de 20 %. Essa mistura foi colocada num tubo de ultra-centrifugação (Beckman), no topo da qual se aplicou cuidadosamente um volume de 3 mL de uma solução de Ficoll a 10 %, seguindo-se a adição de 1 mL de HBS (tampão HEPES). As amostras foram sujeitas a ultra-centrifugação (ultra-centrífuga Beckman) a 100000 g durante 30 minutos e a 4 °C. No caso particular da avaliação da eficiência desta técnica na purificação de lipossomas, a solução de Ficoll a 30 % foi misturada com 0,5 mL de uma solução contendo rAAV (10^{10} rAAV/mL) e, após ultra-centrifugação, procedeu-se à quantificação da concentração de genomas virais em cada uma das fracções, por PCR quantitativo.

4.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação

No caso particular de rAAV encapsulados em lipossomas, a técnica de PCR anteriormente referida permite determinar o número de genomas associados aos lipossomas, possibilitando, juntamente com a quantificação de lípido, o cálculo da eficiência de encapsulação. Deste modo, a eficiência de encapsulação, referida nos capítulos anteriores como eficiência de associação, foi determinada por um método semelhante ao descrito na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 2 desta dissertação (subsecção 2.2.7.3), diferindo apenas na técnica utilizada para quantificar o material genético, a qual se encontra descrita na subsecção 4.2.1 deste capítulo. Foram avaliadas duas concentrações de lípido (4 e 8 mM) e duas concentrações iniciais de vectores virais (1×10^{10} e $2,5 \times 10^{11}$ AAV/mL), tendo-se seleccionado as concentrações de 4 mM de lípido e de 1×10^{10} de AAV/mL para prosseguir o trabalho.

4.2.4. Preparação de lipossomas direccionados contendo rAAV

Os lipossomas foram preparados de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2, no caso de lipossomas direccionados para receptores de transferrina, ou de acordo com o procedimento apresentado no Capítulo 3, no caso da preparação de imunolipossomas direccionados para a E-selectina. A principal diferença a destacar reside no processo de purificação dos lipossomas para remoção de material genético não encapsulado, o qual passou a ser efectuado pela técnica envolvendo o gradiente de Ficoll, em substituição da cromatografia de exclusão molecular recorrendo a colunas de Sefarose. Para além disso, o passo de concentração de lipossomas por ultracentrifugação, efectuado após purificação dos lipossomas, foi também eliminado.

4.2.5. Preparação de misturas de lipossomas e de rAAV

Os lipossomas foram preparados por hidratação do respectivo filme lipídico, com uma solução de HBS a pH 7,4, de modo a obter uma concentração final de 5 mM em lípido total. Os lipossomas foram depois extrudidos utilizando um extrusor contendo membranas de polycarbonato com poros de diâmetro de 200 nm. Após extrusão, procedeu-se à quantificação do colesterol pelo método referido na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 2 desta dissertação. Com base nessa concentração prepararam-se os complexos, de modo a obter a razão nº de genomas por μmol de lípido referida em cada experiência.

Os lipossomas catiónicos foram preparados com DOTAP/CHOL, numa razão molar de 1/1, ou com EPOPC/CHOL numa razão molar de 1/1. No caso de lipossomas catiónicos sensíveis ao pH utilizou-se a composição lipídica DOTAP/DOPE/CHEMS na razão molar de 20/6/4. Os lipossomas de carga negativa foram preparados com PI/EPC/DOPE/CHOL na razão molar de 3/2/3/2, e os lipossomas de carga negativa e sensíveis ao pH foram preparados com DOPE/CHEMS na razão molar de 6/4. As proteínas adjuvantes (albumina sérica humana (HSA) no caso da formulação constituída por EPOPC/CHOL, ou holo-transferrina humana (Tf) em todas as outras formulações) sempre que utilizadas, foram incubadas directamente com os lipossomas na razão de 3,5 mg de proteína por μmol de lípido total, e só depois incubadas com os rAAV.

4.2.6. Culturas celulares

A cultura das células HEK-293 foi efectuada de acordo com o procedimento descrito na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 2. As células HUVEC foram mantidas em cultura de acordo com o procedimento descrito na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 3.

4.2.7. Associação celular de lipossomas direccionados

Os lipossomas direccionados foram preparados conforme descrito anteriormente, procedendo-se no final à quantificação de colesterol. Estes lipossomas foram incubados com as células HEK-293 e HUVEC.

As células HEK-293 foram semeadas em lâminas de 8 poços, previamente revestidas com polilisina. Após 24 horas, as células foram incubadas com os lipossomas marcados com Rh-PE, direccionados para receptores da transferrina, numa concentração de 300 μ M em lípido. Após um período de 4 horas, as células foram lavadas com PBS, fixadas durante 20 minutos com PFA a 4 %, o qual foi finalmente desactivado com uma solução de glicina na concentração 0,1 M. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e finalmente preparadas com o meio de montagem VectaShield contendo DAPI. As células foram analisadas por microscopia confocal, utilizando um microscópio confocal Axiovert 100M e uma objectiva de 63X de imersão em óleo.

No caso das células HUVEC, seguiu-se o procedimento descrito em “Estudos de associação celular” na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 3 desta dissertação, referentes à análise da associação celular de imunolipossomas por citometria de fluxo.

4.2.8. Estudos de transdução

Para análise da eficiência de transdução mediada por lipossomas direccionados, os procedimentos seguidos encontram-se descritos no Capítulo 2 (subsecção 2.2.21), no caso de lipossomas direccionados para a transferrina, e no Capítulo 3 (subsecção 3.2.9), no caso de imunolipossomas direccionados para a E-selectina.

Para testar a influência da temperatura na actividade dos rAAV, procedeu-se à descongelação dos rAAV que foram então mantidos a 4 °C, ou à temperatura ambiente, durante o mesmo período de tempo que o utilizado na preparação de rAAV encapsulados em lipossomas direccionados. Após esse período, os rAAV foram incubados com as células HEK-293, previamente semeadas em placas de 96 poços, com

uma densidade de 3500 células por poço. Como controlo, as células foram igualmente incubadas com rAAV numa razão de 1000 genomas por célula, imediatamente descongelados imediatamente antes da sua utilização. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio novo, e 48 horas depois as células foram lavadas e lisadas para posterior análise da eficiência de transdução.

As misturas de lipossomas e rAAV foram preparadas conforme descrito anteriormente e incubadas com as células HEK-293 e HUVEC, previamente semeadas em placas de 96 poços, numa densidade de 3500 células por poço. A incubação foi efectuada durante 4 horas, com uma quantidade de lipossomas variável, dependendo da razão de rAAV pretendida (nº de genomas virais por célula). Após 48 horas, as células foram lavadas e lisadas para análise da eficiência de transdução.

Com o objectivo de testar a eficiência dos diversos serotipos em células HUVEC, estas foram semeadas em placas de 24 poços, com uma densidade de 10000 células por poço. Após 12 horas, as células foram incubadas com hidroxíureia (HU) (Calbiochem-Novabiochem Corporation), um composto capaz de induzir danos no ADN celular, promovendo deste modo a transdução mediada por rAAV. A HU foi incubada com as células na concentração de 1 mM, durante 12 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, e os diferentes serotipos de rAAV, assim como misturas de lipossomas com rAAV, foram incubados com as células na razão de 20000 genomas por célula durante 4 horas, tendo a quantificação da β -galactosidase sido efectuada 48 horas depois.

4.2.9. Quantificação da expressão da β -galactosidase

A expressão da β -galactosidase foi determinada conforme descrito na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

4.2.10. Associação celular de genomas virais

Para determinar o número de genomas associados às células HEK-293, estas foram semeadas em placas de 6 poços, com uma densidade de 30000 células por poço. As misturas de lipossomas com rAAV a incubar com as células foram preparadas com lipossomas de carga negativa, constituídos por PI/EPC/DOPE/CHOL, com lipossomas catiónicos compostos por EPOPC/CHOL e com lipossomas sensíveis ao pH compostos por DOPE/CHEMS, na presença ou ausência de proteínas adjuvantes, conforme descrito

anteriormente na preparação destas misturas, descrita na subsecção 4.2.5. As misturas foram preparadas na razão de 10^9 genomas de AAV por μmol de lípido total, tendo-se procedido então à sua incubação com as células numa razão de 45000 AAV por célula, durante 4 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e lisadas. Por fim, os lisados foram centrifugados a 20800 g durante 20 minutos a uma temperatura de 4 °C e, finalmente, o sobrenadante foi submetido a quantificação pela técnica de PCR anteriormente descrita.

4.3. Resultados

4.3.1. Optimização de factores críticos relacionados com a encapsulação de rAAV em lipossomas

4.3.1.1. Desenvolvimento de métodos de purificação de lipossomas contendo rAAV

O protocolo de encapsulação de rAAV em lipossomas direccionados seguiu princípios idênticos aos aplicados na preparação de lipossomas contendo poliplexos. Assim, e na sequência desse protocolo, começou-se por aplicar a cromatografia de exclusão molecular aos rAAV livres, com o objectivo de averiguar a eficácia deste método na posterior remoção de rAAVs não encapsulados. Os resultados ilustrados na Figura 4.4 indicam, no entanto, que os rAAV livres são maioritariamente eluídos em fracções próximas da eluição com lipossomas (fracções 7, 8 e 9), de modo que a utilização deste método de separação dos rAAV apresenta riscos de contaminação dos lipossomas com rAAV não encapsulados.

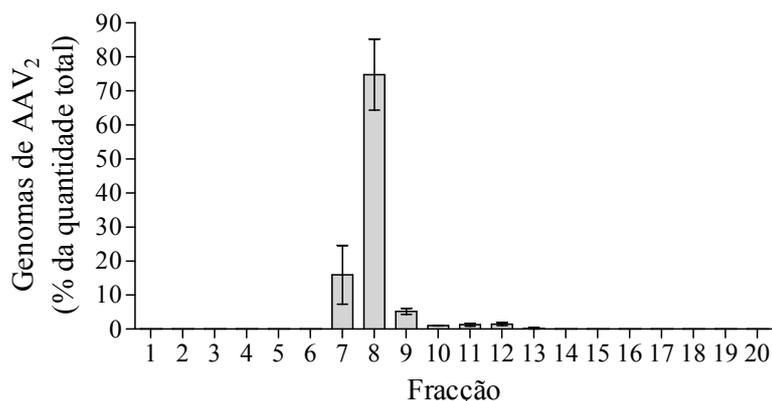


Figura 4.4- Purificação de lipossomas por cromatografia de exclusão molecular

Soluções de PBS contendo rAAV numa concentração de 10^{11} genomas de AAV/mL foram eluídas através de uma coluna de Sefarose CL-4B, previamente equilibrada com PBS. As frações eluídas (0,5 mL) foram sujeitas a análise pela técnica de PCR quantitativo, recorrendo ao instrumento ABI Prism 7000, tendo-se utilizado *primers* e uma sonda (FAM) desenhados para o promotor CMV.

Com base nos dados disponíveis na literatura, analisaram-se dois métodos alternativos de purificação de lipossomas. Um dos métodos baseia-se na separação por cromatografia de afinidade à heparina⁴⁰, e o outro método baseia-se na separação por gradiente de Ficoll⁴¹. De acordo com os resultados obtidos por Zolotkhin e colaboradores⁴⁰, dos vários tipos de heparinas testados, a Heparina-agarose Tipo I foi a que apresentou resultados mais interessantes no que respeita à separação de AAV e posterior recuperação. Apesar da lógica subjacente a esta técnica, os lipossomas direccionados para a transferrina, purificados por este processo, evidenciaram um perfil atípico de associação às células alvo, inviabilizando este procedimento como processo de purificação de lipossomas. Uma desvantagem adicional deste procedimento baseia-se na particularidade de se aplicar exclusivamente a AAV com afinidade para a heparina, como o serotipo 2.

A avaliação do método de purificação por gradiente de Ficoll surgiu da necessidade de identificar um método alternativo aos métodos analisados, que pudesse ser aplicado de um modo mais abrangente aos vários serotipos. Este processo tem sido descrito para remoção de ADN não encapsulado em lipossomas⁴¹. De acordo com este método, o ADN livre fica retido na fracção correspondente à maior concentração de Ficoll (20 %). Paralelamente, espera-se que os rAAV fiquem retidos nessa mesma fracção, uma vez que a sua densidade (1,41)¹⁷ é superior à da solução contendo 20 % de

Ficoll. Pelo contrário, os lipossomas migram para a interface HBS/Ficoll 10 %, conforme se pode observar no esquema da Figura 4.5.

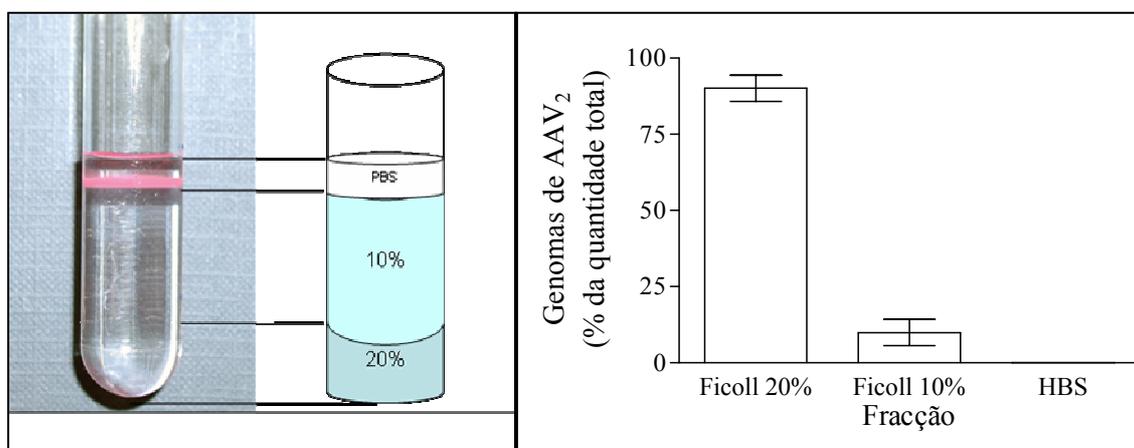


Figura 4.5- Purificação de lipossomas por gradiente de Ficoll

Um volume de 0,5 mL de uma solução contendo 1×10^{10} AAV/mL foi misturado com um volume de 1 mL de Ficoll a 30 %, originando uma solução de Ficoll a 20 %. No topo desta fracção colocaram-se 3 mL de uma solução de Ficoll a 10 %, e no topo desta 1 mL de PBS. Após ultra-centrifugação a 100000 g, as diversas fracções foram analisadas pela técnica de PCR quantitativo, utilizando *primers* e uma sonda (FAM) desenhados para o promotor CMV. No processo de quantificação foi utilizado o aparelho ABI Prism 7000.

Os resultados obtidos demonstram que aproximadamente 85 % dos genomas de rAAV se mantêm na fracção correspondendo à solução que contém 20 % de Ficoll, ao passo que os lipossomas migram para a interface entre o HBS e a fracção correspondendo à solução a 10 % de Ficoll, evidenciando que este processo de purificação é eficiente na separação de rAAV não encapsulados dos lipossomas contendo rAAV.

4.3.1.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação de AAV₂ em lipossomas foi determinada pela técnica de PCR quantitativo. Na tentativa de otimizar os valores da eficiência de encapsulação, testaram-se duas concentrações diferentes de lípido. Assim, a preparação de lipossomas partindo de uma concentração inicial de 4 mM de lípido e de 10^{10} AAV/mL, resultou numa eficiência de encapsulação de 1,1 % (Figura 4.6). O aumento da concentração de lípido para 8 mM, mantendo constante a concentração dos rAAV, assim como o aumento da concentração do lípido acompanhado do aumento da concentração das partículas virais para $2,5 \times 10^{11}$ AAV/mL, não resultou numa variação acentuada da

eficiência de encapsulação (Figura 4.6). Os baixos valores da eficiência de encapsulação não são surpreendentes, sendo consequência do processo de encapsulação passivo utilizado. A utilização de estratégias que usualmente promovem a encapsulação de compostos, tal como o congelamento/descongelamento é contudo desaconselhável, uma vez que conduzem à perda de actividade dos rAAV.

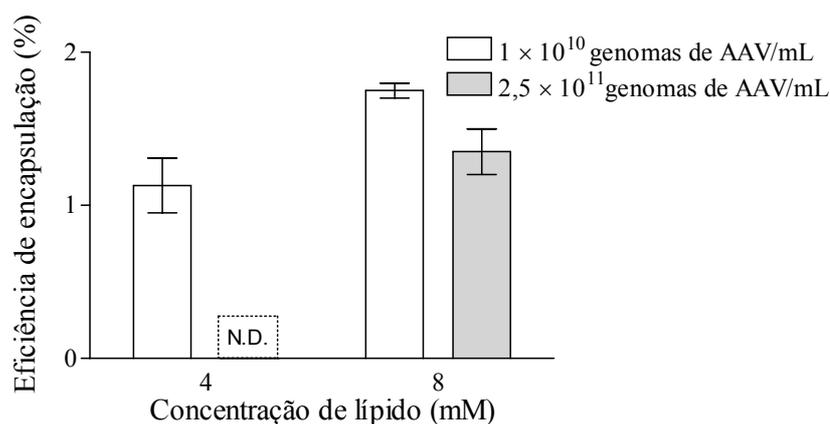


Figura 4.6- Eficiência de encapsulação em função das concentrações iniciais de lípido e de AAV

Os filmes lipídicos foram hidratados com 0,5 mL de uma solução contendo rAAV em concentrações de 1×10^{10} , e $2,5 \times 10^{11}$ genomas de rAAV/mL. Os filmes lipídicos foram preparados de tal modo que a concentração final de lípido fosse de 4 ou de 8 mM. Após extrusão por membranas com poro de 200 nm, os rAAV não encapsulados foram removidos por centrifugação em gradiente de Ficoll. As amostras resultantes foram analisadas em termos de quantidade de lípido e de genomas de rAAV. Esta análise foi também efectuada nas amostras logo após hidratação do filme lipídico. A eficiência de encapsulação foi determinada em função destes valores.

As experiências subsequentes foram efectuadas com as concentrações de 4 mM de lípido e de 1×10^{10} de AAV/mL.

4.3.2. Eficiência de transdução de lipossomas contendo rAAV, direccionados para o receptor da transferrina

4.3.2.1. Associação celular mediada por lipossomas direccionados

Após identificação da técnica mais apropriada para purificação dos lipossomas contendo rAAV, prosseguiu-se para a avaliação da eficiência de associação celular de lipossomas direccionados para receptores da transferrina. Nestas experiências utilizaram-se células HEK-293, conhecidas por expressarem receptores para a transferrina. Os resultados obtidos por microscopia confocal comprovam que a presença

de transferrina acoplada aos lipossomas permite aumentar a associação destes às células (Figura 4.7).

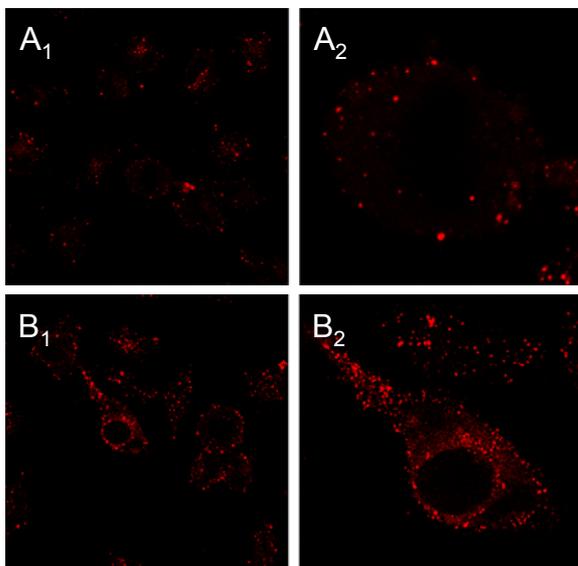


Figura 4.7- Associação celular de lipossomas contendo rAAV direccionados para receptores da transferrina

Os lipossomas, previamente marcados com Rh-PE e contendo rAAV, foram preparados na concentração de 4 mM e incubados na concentração de lípido de 300 μ M, durante 4 horas com células HEK-293. (A) Células incubadas com lipossomas não direccionados; (B) Células incubadas com lipossomas direccionados para o receptor da transferrina. Das imagens A₁ e B₁ seleccionou-se uma célula, utilizando o Software associado ao microscópio, a qual se encontra ampliada em A₂ e B₂, respectivamente. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio confocal Axiovert 100M e uma objectiva de 63 \times .

Estes resultados são semelhantes aos apresentados no Capítulo 2 desta dissertação, referentes a lipossomas vazios conjugados com transferrina, demonstrando que o processo de encapsulação utilizado não interfere na extensão de associação celular de lipossomas, facto que evidencia a ausência de rAAV adsorvidos à superfície dos lipossomas. A observação das células permite identificar lipossomas ligados à membrana plasmática, mas também no citoplasma, verificando-se ainda acumulação de lípido na região perinuclear.

4.3.2.2. Estudos de transdução

Apesar dos resultados de associação celular indicarem que os lipossomas direccionados, contendo AAV, são internalizados pelas células HEK-293, estes lipossomas não demonstraram eficiência de transdução (Figura 4.8). Contudo, os rAAV incubados com as células na mesma razão de rAAV (150 AAV por célula) induziram

expressão do transgene, apesar de baixa, em consequência da baixa concentração de rAAV. A concentração de vectores utilizada para transduzir as células encontra-se limitada pelos baixos valores obtidos para a eficiência de encapsulação. Os complexos ternários compostos por DOTAP/CHOL/Tf/ADN, utilizados como controlo positivo, foram incubados com as células HEK-293 numa razão de $2,7 \times 10^7$ plasmídeos por célula (0,5 µg ADN por poço), resultando numa elevada expressão do transgene, o que comprova que as células se encontram funcionais.

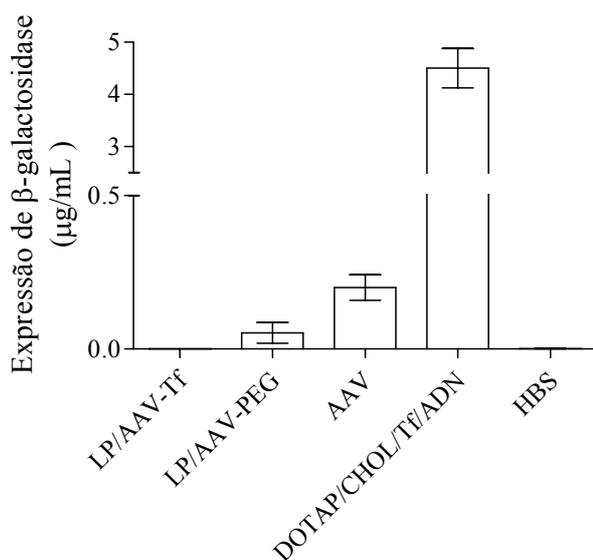


Figura 4.8- Actividade de transdução mediada por lipossomas contendo rAAV, direccionados para receptores da transferrina

As células HEK-293 foram semeadas em placas de 24 poços, com uma densidade de 10000 células por poço. Os lipossomas contendo AAV₂pCMVLacZ, direccionados para receptores de transferrina, foram preparados na concentração de 4 mM e incubados com as células, na concentração de 300 µM em lípido, durante 4 horas. Os lipossomas controlo, não direccionados, foram incubados com as células nas mesmas condições. A concentração de lípido referida corresponde a uma concentração de 150 genomas de AAV por célula. Os controlos positivos consistem em vectores não encapsulados (150 rAAV por célula) e complexos ternários compostos por DOTAP/DOPE/Tf/ADN (0,5 µg de pCMVLacZ ADN por poço). Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois a actividade de transdução foi avaliada por quantificação da β-galactosidase.

Com o objectivo de demonstrar que a falta de eficiência da formulação não se deve às condições experimentais envolvidas na sua preparação, realizaram-se experiências nas quais os rAAV foram submetidos a diferentes temperaturas por um período de tempo equivalente ao da preparação da formulação. Os resultados ilustrados na Figura 4.9 evidenciam que estes vectores não são sensíveis à temperatura de

trabalho, após descongelamento, sugerindo que a ineficiência da formulação não está associada à perda da actividade biológica dos rAAV ao longo do tempo.

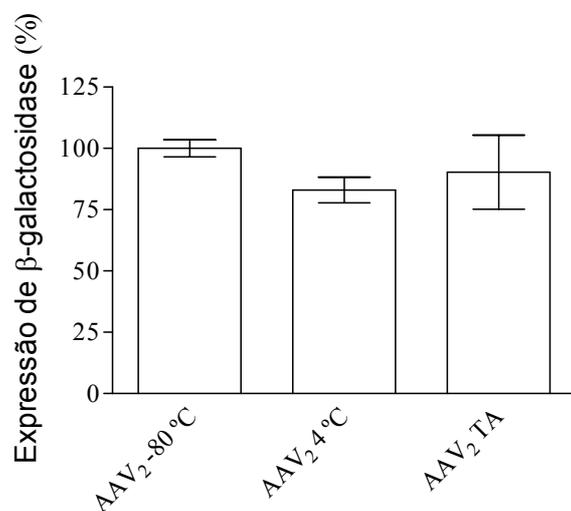


Figura 4.9- Efeito da temperatura na actividade dos rAAV

As células HEK-293 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 3500 células por poço. Os rAAV foram descongelados e mantidos a 4 °C (AAV₂ 4 °C) ou à temperatura ambiente (AAV₂ TA) durante um período equivalente ao da preparação dos lipossomas. Após esse período, as células foram incubadas com uma concentração de 1000 rAAV por célula. Os rAAV controlo correspondem a vectores que foram descongelados imediatamente antes da incubação com as células (AAV₂ -80 °C). Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois a actividade biológica foi avaliada por quantificação da β -galactosidase.

À semelhança do Capítulo 2, também neste caso se pode especular que a ausência de transdução poderá resultar da entrega insuficiente de rAAV às células, consequência da baixa eficiência de encapsulação e/ou da baixa extensão da associação dos lipossomas às células. Independentemente destes factores, a hipótese segundo a qual a elevada eficiência de transdução que caracteriza estes vírus seria suficiente para se sobrepor aos factores limitativos acima referidos, não se verificou. Apesar da elevada eficiência de transdução comumente atribuível a estes vectores, Zentilin e colaboradores⁴² referem que estes vírus, apesar de extremamente eficientes a transduzir neurónios e músculo, se têm revelado menos eficientes a transduzir linhas celulares, o que poderá adicionalmente justificar os resultados observados. Para além disso, não é de excluir a hipótese de que a entrega dos AAV às células mediada por lipossomas, os conduzam por vias que inviabilizem a expressão do transgene.

Apesar dos resultados obtidos, considerou-se premente avaliar a eficiência de imunolipossomas contendo AAV em células endoteliais, não só porque a associação de imunolipossomas a estas células ocorre numa extensão elevada, mas também porque continua por determinar se a internalização dos rAAV em células endoteliais, mediada por imunolipossomas, permitirá a expressão significativa do transgene.

4.3.3. Actividade de transdução de lipossomas contendo rAAV, direccionados para a E-selectina

4.3.3.1. Associação celular mediada por lipossomas direccionados

Os resultados obtidos por citometria de fluxo (Figura 4.10) demonstram que os imunolipossomas contendo rAAV mantêm a mesma extensão de associação que os imunolipossomas vazios conforme descrito no Capítulo 3 desta dissertação. Deste modo, aproximadamente 70 % das células activadas e incubadas com imunolipossomas são positivas para o marcador Fluor-PE, incorporado na bicamada lipídica, ao contrário do observado para células quiescentes incubadas com lipossomas não direccionados ($p = 0,0002$). A especificidade da associação observada está em consonância com os resultados obtidos com lipossomas direccionados para os receptores da transferrina, confirmando a ausência de rAAV adsorvidos à superfície dos imunolipossomas.

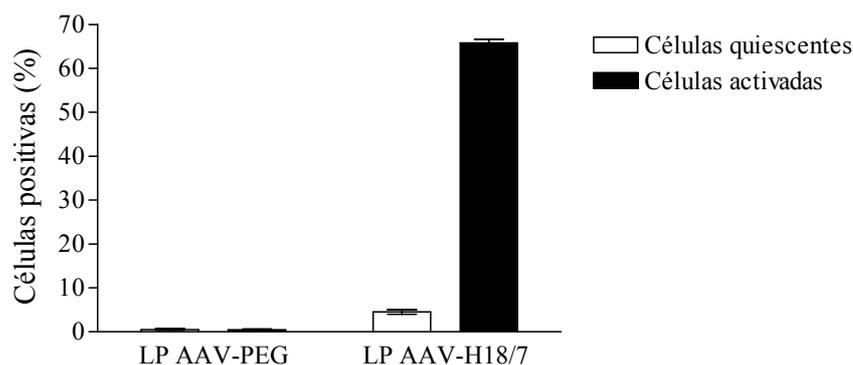


Figura 4.10- Extensão da associação celular de imunolipossomas contendo rAAV a células HUVEC

Os imunolipossomas marcados com Fluor-PE e contendo rAAV₂pCMVLacZ foram preparados na concentração lipídica de 4 mM e incubados com células HUVEC, activadas ou quiescentes, durante 4 horas, na concentração de 80 μ M (LP AAV- H18/7). Os lipossomas não direccionados (LP AAV- PEG) foram incubados com as células nas mesmas condições. A activação das células com TNF- α , na concentração de 100 ng/mL, teve início uma hora antes da incubação com os lipossomas e prosseguiu durante as 4 horas de incubação destes. Após esse período, as células foram lavadas e o número de células positivas para a associação de lípido foi

determinada por citometria de fluxo. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0002 após comparação dos valores correspondentes à associação celular mediada por imunolipossomas (LP AAV-H18/7) em células activadas e em células quiescentes.

4.3.3.2. Eficiência de transdução mediada por lipossomas direccionados

Tal como referido na “Introdução” deste capítulo, são frequentes as referências bibliográficas mencionando a ineficiência dos rAAV em transduzir células endoteliais vasculares³². Assim, nesta secção descrevem-se os resultados obtidos relativos a estudos que tiveram como objectivo determinar se a encapsulação de AAV em lipossomas direccionados permite ultrapassar a hipotética limitação de entrada destes nas células endoteliais, possibilitando-lhes assim exhibir as suas propriedades de transdução nestas células. A corroborar esta hipótese, existe um trabalho referido por Lieber³², onde se refere ser possível seleccionar a partir de um conjunto de rAAV apresentando determinadas mutações nas proteínas da cápside, um vector específico capaz de transduzir células endoteliais.

Contudo, os resultados apresentados na Figura 4.11, demonstram que apesar dos níveis de associação dos imunolipossomas às células HUVEC serem elevados, continuou a não se verificar transdução.

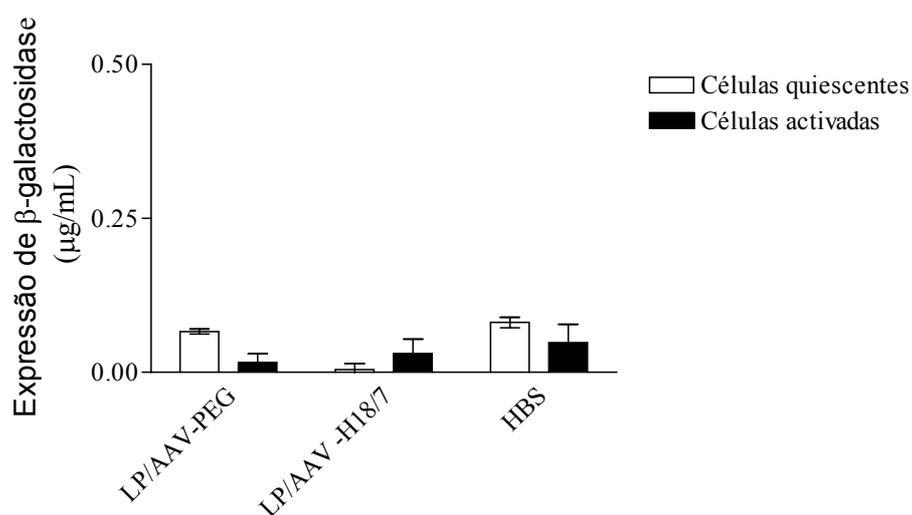


Figura 4.11- Eficiência de transdução dos imunolipossomas contendo rAAV, direccionados para a E-selectina

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo rAAV₂pCMVLacZ, foram preparados na concentração de 4 mM e incubados com células HUVEC, activadas ou quiescentes, durante 4 horas, na concentração de 80 µM (LP AAV- H18/7). Os lipossomas não direccionados (LP

AAV- PEG) foram incubados com as células nas mesmas condições. A activação das células com TNF- α , na concentração de 100 ng/mL, teve início uma hora antes da incubação com os lipossomas e prosseguiu durante as 4 horas seguintes durante a incubação daqueles. Após esse período, as células foram lavadas, e 48 horas depois a actividade de transdução foi avaliada por quantificação da β -galactosidase.

Face a estes resultados, torna-se difícil apurar os factores responsáveis pela ineficiência da formulação, assim como adiantar hipóteses sobre os mecanismos de funcionamento dos rAAV. Resta-nos, pelo contrário, alargar o leque das razões que podem condicionar a eficiência da formulação. Assim, e a par da limitação na quantidade de rAAV entregue às células, e da possibilidade que os mecanismos envolvidos na internalização celular inviabilizem a transdução (já discutido nos resultados relativos à entrega dos rAAV mediada por lipossomas direccionados com transferrina), não é igualmente de descurar que as células HUVEC sejam incapazes de transformar o ADN viral de cadeia simples em ADN de cadeia dupla, impedindo deste modo a transcrição e consequentemente a expressão do transgene.

Apesar destes resultados, é de realçar que tantos os lipossomas direccionados para os receptores da transferrina, como os lipossomas direccionados para a E-selectina, permitiram atingir o primeiro objectivo delineado neste capítulo, o qual consiste na interacção específica de lipossomas direccionados contendo rAAV com as respectivas células alvo.

4.3.4. Modulação da transdução de células HEK-293 mediada por misturas de rAAV e lipossomas

Com o objectivo de excluir a possibilidade de que o insucesso da transdução mediada por rAAV₂ encapsulados em lipossomas direccionados, pudesse resultar da complexidade das formulações desenvolvidas, e inspirados nos resultados reportados por outros autores⁴³⁻⁴⁶, segundo os quais a mistura de lipossomas pré-formados com vários tipos de vírus lhes aumenta a capacidade de transdução, optou-se por avaliar a eficiência de complexos preparados de acordo com este mesmo procedimento.

Tendo por base este protocolo simplificado de preparação de complexos lipossomas/vírus, testaram-se várias formulações lipossómicas, variando a natureza dos lípidos e alternando entre a presença e ausência de proteínas adjuvantes, no pressuposto de que as diferentes propriedades dos complexos resultantes pudessem de algum modo contribuir para o efeito referido por outros investigadores.

As primeiras experiências foram realizadas em células HEK (Figura 4.12) utilizando rAAV numa razão de 1000 genomas por célula. Os rAAV foram previamente misturados com os diferentes lipossomas numa razão de 10^9 AAV por μmol de lípido total. A quantidade de β -galactosidase resultante foi expressa em função da concentração da β -galactosidase induzida por rAAV, condição utilizada como controlo. O primeiro grupo de condições testadas (A) demonstrou que os lipossomas catiónicos constituídos por DOTAP/CHOL não aumentam a transdução mediada por rAAV, e que nem mesmo a adição de lípidos que conferem sensibilidade ao pH aos lipossomas (DOTAP/DOPE/CHEMS) permitiu alterar esses resultados. Num outro grupo de experiências (B) testou-se o efeito da presença e ausência de proteínas adjuvantes (albumina sérica humana e transferrina humana), utilizando lipossomas catiónicos (EPOPC/CHOL) e negativos (DOPE/CHEMS e PI/EPC/DOPE/CHOL). A razão subjacente à utilização de lipossomas com carga negativa assenta no facto destes vírus apresentarem maioritariamente carga positiva a pH 7,4⁴⁷, facto que não favorece a sua interacção com os lipossomas catiónicos. Porém, em nenhuma das condições referidas se observou o efeito esperado na transdução em relação aos rAAV livres. Um outro grupo de experiências (C) envolveu a transdução mediada por rAAV após mistura com o polímero PEI. Os resultados sugerem a existência de competição entre o polímero PEI e os rAAV, uma vez que a presença deste polímero inibe a transdução dos vírus, inibição essa que é tanto mais acentuada quanto maior a quantidade de polímero misturado com os rAAV.

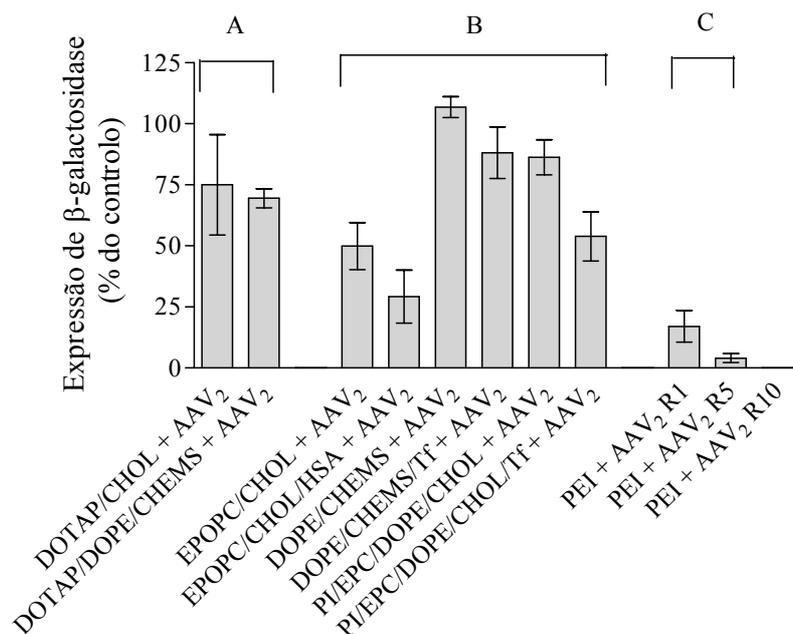


Figura 4.12- Transdução de células HEK-293 mediada por misturas de AAV e lipossomas

As células HEK-293 foram semeadas com uma densidade de 3500 células por poço, em placas de 96 poços. Após 24 horas, estas foram incubadas com misturas de lipossomas e rAAV numa concentração de 1000 AAV por célula, preparadas numa razão de 10^9 AAV por μmol de lípido total. As misturas de lipossomas utilizadas no grupo A foram preparadas utilizando lipossomas de DOTAP/CHOL ou lipossomas catiónicos sensíveis ao pH preparados com DOTAP/DOPE/CHEMS. As formulações do grupo B consistem em lipossomas catiónicos preparados com EPOPC/CHOL, na presença ou ausência de albumina sérica humana (HSA), lipossomas sensíveis ao pH compostos por DOPE/CHEMS e lipossomas aniónicos compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL, ambos com ou sem transferrina humana. As proteínas adjuvantes foram adicionadas numa razão de 3,5 μg de proteína por nmol de lípido total. No grupo C utilizou-se o polímero PEI misturado com AAV nas razões de $1,59 \times 10^9$ (R1), $7,95 \times 10^8$ (R5) e $1,59 \times 10^8$ (R10) AAV por μg PEI. Após um período de incubação de 4 horas, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois procedeu-se à quantificação da expressão da β -galactosidase.

Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou uma razão de 10^8 rAAV por μmol de lípido total (resultados não apresentados). No seu conjunto, estes resultados sugerem que a variação da carga e da composição lipídica dos lipossomas, assim como a utilização de polímeros catiónicos, não permitem promover a transdução mediada pelos rAAV em células HEK-293.

No sentido de avaliar se os níveis de transdução observados eram reflexo do número de partículas virais entregue às células, optou-se pela quantificação dos genomas associados às células após incubação com as formulações testadas no grupo B da Figura 4.12. Como se pode observar na Figura 4.13, não se verificam diferenças assinaláveis entre as diferentes formulações, facto que dificulta a utilização desta metodologia na

correlação entre o número de genomas associados às células e os níveis de transdução observados. Apesar da análise destes resultados dever ser realizada com prudência, eles poderão indicar que a diminuição da transdução relativamente aos rAAV livres será devida a eventos pós-associação celular dos lipossomas.

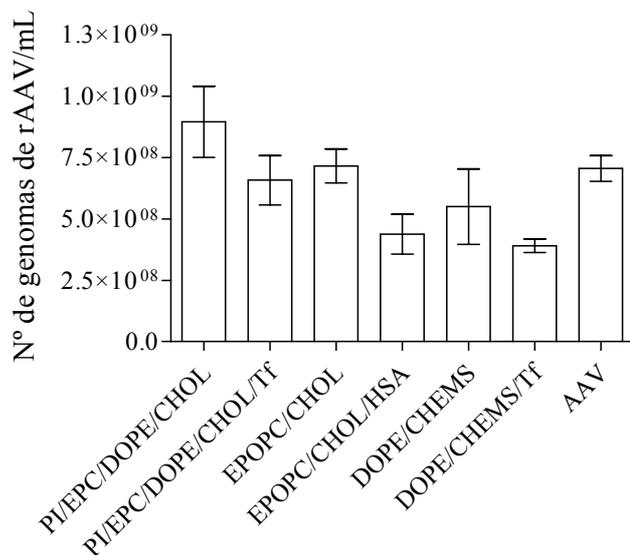


Figura 4.13- Quantificação de genomas virais associados às células

As células HEK-293 foram semeadas em placas de 6 poços, com uma densidade de 30000 células por poço. As misturas de lipossomas com rAAV foram preparadas com lipossomas negativos constituídos por PI/EPC/DOPE/CHOL, com lipossomas catiónicos compostos por EPOPC/CHOL ou por lipossomas sensíveis ao pH, compostos por DOPE/CHEMS, na presença ou ausência de transferrina, no caso das formulações de lipossomas negativos e sensíveis ao pH, ou de albumina sérica humana, no caso da formulação catiónica (3,5 µg proteína por nmol de lípido total). As misturas foram preparadas numa razão de 10⁹ AAV por µmol de lípido total. As células foram incubadas com os rAAV numa concentração de 45000 AAV por célula durante 4 horas, após o que foram lavadas com PBS e lisadas. Por fim, os lisados foram sujeitos a quantificação pela técnica de PCR quantitativo.

Apesar da crescente popularidade dos rAAV, os mecanismos moleculares subjacentes à sua elevada eficiência de transdução em determinados tecidos continua por esclarecer. Na Tabela 4.1 encontram-se referidos os principais factores que, de um modo geral, poderão constituir barreiras à transdução mediada por rAAV associados a lipossomas. No seu conjunto, os resultados obtidos com as células HEK-293 indicam que estas são permissivas à transdução por rAAV livres, não se verificando limitações, quer de entrada quer de processamento, que impeçam completamente a expressão do transgene. Contudo, a encapsulação dos rAAV em lipossomas direccionados não favorece a sua expressão (Figura 4.8), provavelmente porque a quantidade de vectores

que entra nas células é insuficiente. Tanto nesta condição, como nas condições em que se recorre à mistura de lipossomas com rAAV, não se pode desprezar a hipótese de que os lipossomas conduzam os rAAV por vias que impeçam a sua transdução, por exemplo, por dificultarem o transporte para o núcleo^{48,49}, ou por condicionarem a libertação do genoma viral da cápside⁵⁰.

Tabela 4.1- Factores limitativos da transdução

Factores limitativos da transdução		
Etapas	Condicionantes	
	Formulação	Celulares
Ligação celular	Carga de superfície	Nº de receptores à superfície celular
	Afinidade receptor/ligando	
	Eficiência de acoplamento de proteínas (ligando)	Existência de matriz extracelular (heparanos)
	Disposição das proteínas (ligando) associadas ou acopladas	
Via de internalização celular	Tamanho	Processamento do receptor
	Carga	Actividade endocítica das células
	Presença de proteínas (ligandos)	
Libertação do endossoma	Composição dos lipossomas (sensibilidade ao pH)	?
	Presença de proteínas (ligando) com propriedades fusogénicas	
	Proteínas virais com propriedades fusogénicas	
Degradação no proteossoma	Proteínas virais	?
Transporte nuclear	Tamanho das partículas	?
	Integridade do transportador	
	Interação com proteínas citoplasmáticas contendo NLS	
Processamento do genoma viral	Influência da formulação no processo de libertação do genoma viral da sua cápside	Incapacidade de transformar o ADN de cadeia simples em cadeia dupla

4.3.5. Permissividade das células HUVEC à transdução mediada por rAAV

Alertados por dados reportados na literatura para a dificuldade em transduzir células endoteliais com rAAV, optou-se numa primeira fase por efectuar uma avaliação mais sistemática sobre a permissividade das células HUVEC a este tipos de vectores. Assim,

procedeu-se à incubação das células com vários serotipos virais, paralelamente à estimulação química da maquinaria genética das células com hidroxureia (HU).

A utilização desta estratégia foi baseada no facto de o processamento do ADN dos rAAV ser promovido pela activação de mecanismos de reparação de ADN das células, a qual pode resultar da utilização de agentes que induzem danos no genoma celular, como a hidroxureia^{51,52}. Está descrito que a estimulação da transdução mediada pelos rAAV recorrendo à HU aumenta a ligação do ADN dos AAV à Rad52, uma proteína envolvida na reparação de quebras na cadeia dupla de ADN⁴², e que provavelmente auxiliará na conversão do ADN viral de cadeia simples em cadeia dupla, conferindo-lhe propriedades adequadas para a expressão do transgene. Os resultados ilustrados na Figura 4.14 demonstram, contudo, que nenhum dos serotipos testados apresentou eficiência de transdução, nem na presença, nem na ausência de HU. Com base nestes resultados conclui-se que as células HUVEC não são permissivas à transdução por rAAV do tipo 1, 2, 6 e 8. Tal como referido anteriormente, a falta de sucesso observada na transdução de células endoteliais pode ser consequência de limitações na entrega de rAAV às células, e/ou do processamento destes após internalização celular.

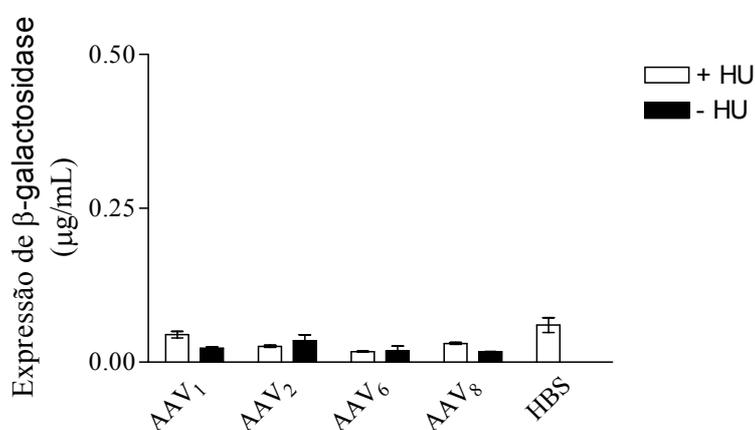


Figura 4.14- Actividade de transdução de vários serotipos em células HUVEC, na presença de hidroxureia

As células HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços, numa densidade de 10000 células por poço. Em algumas condições, as células foram incubadas com hidroxureia (HU) numa concentração de 1 mM, durante um período de 12 horas, após o qual as células (com ou sem HU) foram incubadas com os diferentes serotipos de rAAV. Após um período de incubação de 4 horas, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois procedeu-se à quantificação da expressão da β -galactosidase.

Apesar dos resultados obtidos em células HEK-293 não sugerirem vantagens na associação celular ou transdução resultantes da mistura de rAAV com vários tipos de lipossomas, considerou-se que as diferenças inerentes aos diversos tipos celulares, só por si, justificam que se efectuem experiências semelhantes em HUVEC. A observação de transdução nestas circunstâncias seria indicativo de que a ausência de expressão do transgene apresentada pelos rAAV livres, se deve de facto a limitações de internalização pelas células HUVEC, as quais poderiam ser supridas pela associação a lipossomas. Adicionalmente, tais resultados seriam indicativos de que a ausência de transdução observada aquando da incubação de imunolipossomas com células endoteliais activadas, seria consequência da entrega de número insuficiente de vectores virais às células alvo.

Assim, no sentido de potenciar a internalização dos rAAV, e consequentemente a transdução, procedeu-se à mistura destes com lipossomas catiónicos, utilizando uma razão de 10^9 genomas virais por μmol de lípido total. Em termos de partículas virais foram utilizadas 200, 1000 e 5000 rAAV por célula. Os resultados obtidos revelam que os lipossomas constituídos por DOTAP/CHOL não induziram expressão do transgene em células HUVEC, e nem a adição de lípidos com sensibilidade ao pH (DOTAP/DOPE/CHEMS) alterou tais resultados (Figura 4.15). Adicionalmente, as misturas de lipossomas com os rAAV foram efectuadas quer na presença, quer na ausência de transferrina, sem que os resultados indicassem eficiência de transdução. Paralelamente, foram efectuadas experiências em células HEK-293, garantindo que a ausência de expressão do transgene observada não se deve à qualidade dos rAAV utilizados (resultados não apresentados).

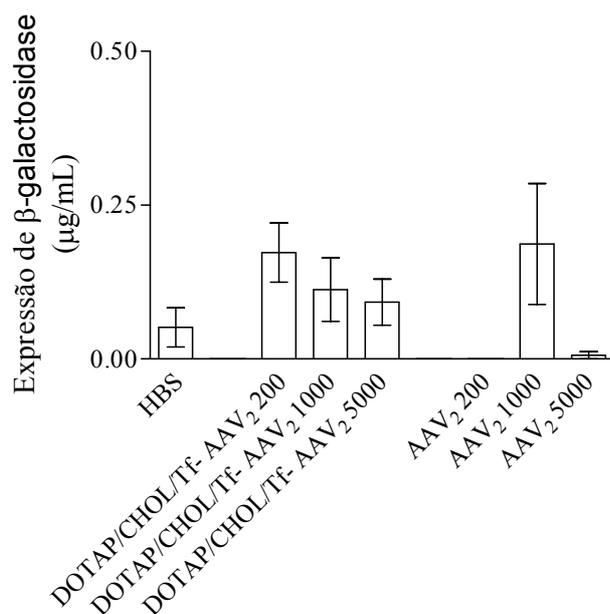


Figura 4.15- Atividade biológica de misturas de AAV e lipossomas em células HUVEC

As células HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 3500 células por poço. As células foram incubadas com misturas de rAAV₂ e lipossomas correspondendo a concentrações crescentes de rAAV (200, 1000 e 5000 rAAV por célula), preparadas numa razão de 10^9 AAV por μmol de lípido total. As misturas foram preparadas utilizando lipossomas de DOTAP/CHOL na presença de transferrina, numa razão de 3,5 μg transferrina por nmol de lípido total. Como controlo positivo, os rAAV foram incubados com as células nas mesmas condições, mas na ausência de lipossomas. Após um período de incubação de 4 horas, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois procedeu-se à quantificação da expressão da β -galactosidase.

Numa última abordagem, procedeu-se ao aumento da quantidade de rAAV incubados com as células para razões de 10000 e 15000 AAV por célula, utilizando lipossomas compostos por DOTAP/DOPE/CHEMS. Conforme observado na Figura 4.16, os resultados não indicam qualquer vantagem resultante do aumento do número dos genomas virais incubados com as células.

Ainda sem excluir a hipótese de que a falta de sucesso observada fosse devida simultaneamente a limitações de internalização e à ineficiência dos mecanismos adequados para transformação de ADN de cadeia simples em ADN de cadeia dupla, estas experiências foram igualmente realizadas na presença de HU. No entanto, também nestas condições não se verificou qualquer efeito na transdução (Figura 4.16).

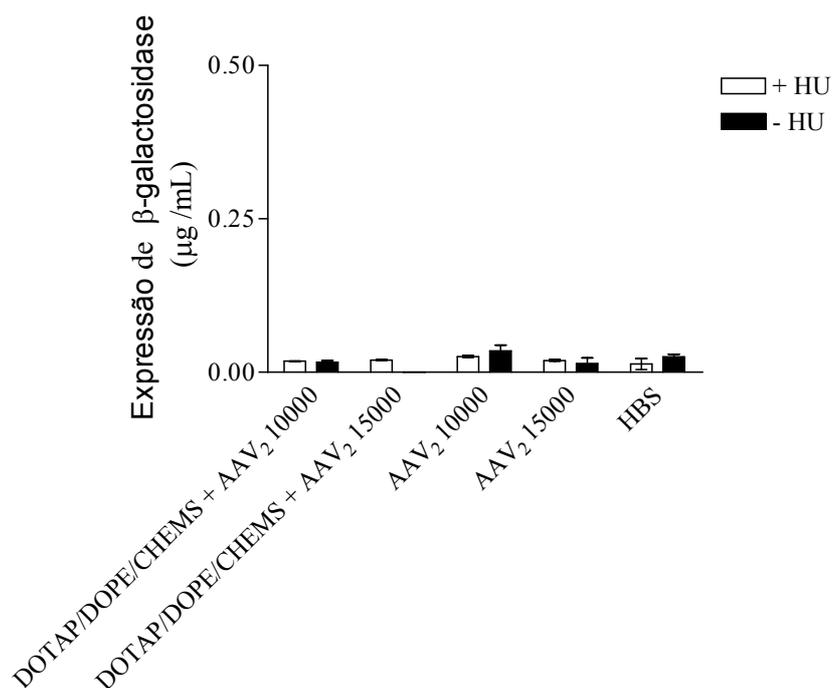


Figura 4.16- Efeito da hidroxiureia na actividade biológica de misturas de AAV e lipossomas em células HUVEC

As células HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade de 3500 células por poço, e em algumas condições pré-incubadas com hidroxiureia (HU) na concentração de 1 mM. As células foram incubadas com misturas de lipossomas e rAAV correspondendo a duas concentrações diferentes de rAAV (10000 e 15000 rAAV por célula), preparadas numa razão de 10^9 AAV por μmol de lípido total. As misturas foram preparadas utilizando lipossomas catiónicos sensíveis ao pH contendo DOTAP/DOPE/CHEMS. Após um período de incubação de 4 horas, o meio foi substituído por meio novo, e 48 horas depois procedeu-se à quantificação da expressão da β -galactosidase.

Experiências paralelas foram efectuadas com lipossomas de carga negativa, compostos por PI/EPC/DOPE/CHOL, na presença e ausência de transferrina humana. A utilização de lipossomas aniónicos na transdução de células HUVEC, justifica-se pelo facto das células endoteliais produzirem sulfato de heparano, o qual não só é expresso à superfície das células, servindo de receptor natural para a entrada dos rAAV, como também é segregado para formação da matriz extracelular^{53,54}. Esta matriz, por sua vez, pode ser a responsável pelo impedimento da internalização não só dos rAAV, levando ao insucesso da transdução nestas células, mas também dos lipossomas catiónicos, devido à sua interacção electrostática com as moléculas de heparano da matriz celular, as quais apresentam carga negativa⁵⁵. Contudo, a utilização de lipossomas com carga negativa não resultou nos efeitos esperados. Este cenário não foi alterado após incorporação do ligando transferrina nos complexos, o que poderia aumentar a

interacção com as células mediada pelo receptor do referido ligando, nem após utilização de razões de AVV /lípidos mais elevadas (10^{10} AVV por μmol de lípidos total).

A informação existente sobre a utilização de lipossomas catiónicos para promoção da transdução de células por rAAV é muito escassa, e os dois trabalhos encontrados neste âmbito apresentam resultados divergentes. Assim, a aplicação desta estratégia em células de glioma humano permitiu um aumento de 6 vezes nos níveis de transdução⁴⁴, enquanto que a utilização de uma estratégia semelhante, aplicada ao hipocampo de cérebro de rato, demonstrou que a presença de lipossomas catiónicos não afectou a transdução mediada por estes vectores⁵⁶, demonstrando que os efeitos obtidos podem divergir em função do tipo de células em causa.

Sistematizando, e recorrendo à Tabela 4.1, podemos especular que no caso das células HUVEC a matriz extracelular poderá ser um factor limitativo à entrada de lipossomas catiónicos e dos rAAV nas células. Esta limitação poderia ser ultrapassada por recurso a lipossomas de carga negativa, tal como os utilizados para encapsular e direccionar os rAAV para a E-selectina. No entanto, neste caso específico, e apesar da ligação às células endoteliais ser bastante eficiente, estes lipossomas transportam uma baixa quantidade de rAAV. Este facto poderá ter condicionado a entrega de rAAV às células, comprometendo potencialmente a transdução. A solução empiricamente utilizada para vencer o obstáculo da entrega insuficiente de material genético às células, passa normalmente pela utilização de lipossomas catiónicos. Neste caso particular, é possível que a utilização destes sistemas tenha sido inviabilizada não só pela referida matriz de heparano de sulfato, mas também pela carga de superfície positiva dos vírus, a qual pode limitar a sua interacção com os lipossomas catiónicos. Assim, talvez por estas razões, os rAAV não tenham demonstrado eficiência nas circunstâncias referidas. Adicionalmente, considerou-se a possibilidade de que a falta de eficiência fosse devida à incapacidade dos rAAV em escapar dos endossomas para o citoplasma. Como tal, foram incorporados nas formulações lípidos sensíveis ao pH, com o objectivo de facilitar a libertação do endossoma, sem que se tivesse observado qualquer efeito assinalável.

Tal como sugerido para as células HEK-293, pode igualmente suceder que nas células HUVEC os lipossomas mediem a internalização celular dos vírus por vias que dificultem o transporte nuclear, ou impeçam a correcta libertação do genoma viral a partir da cápside, daí resultando a diminuição da transdução.

Adicionalmente, a degradação das proteínas virais no proteossoma⁵⁷, apesar de não ter sido avaliada, poderá também contribuir para a ineficiência da transdução, mesmo em rAAV misturados com lipossomas.

Finalmente, e apesar das experiências realizadas envolvendo a indução de danos no ADN, é importante ter presente a hipótese de que os mecanismos envolvidos na conversão de ADN de cadeia simples em cadeia dupla não se verifiquem nestas células, pelo menos não ao nível necessário. A clarificação destes aspectos, que seria crucial para ajudar a explicar os resultados observados, está dependente do conhecimento, ainda escasso, sobre os mecanismos envolvidos na transdução mediada por rAAV.

Apesar do esforço despendido, e face aos resultados obtidos, é-nos impossível tirar conclusões sobre os factores limitativos da transdução mediada por rAAV nas células testadas. Ainda que da perspectiva científica seja interessante desvendar os mecanismos subjacentes ao funcionamento dos rAAV, este não é, no entanto, o principal objectivo desta dissertação. Como tal, optou-se por voltar à questão principal deste trabalho, a qual consiste em desenvolver formulações eficientes para a entrega de genes, especificamente a células endoteliais activadas. Perante as dificuldades encontradas com os rAAV, optou-se por testar a encapsulação de vectores adenovirais, tema que será objecto do próximo capítulo.

4.4. Bibliografia

- 1 Flotte TR *et al.* Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 10613-10617.
- 2 Kessler PD *et al.* Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 14082-14087.
- 3 Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996; **70**: 8098-8108.
- 4 Clark KR, Sferra TJ, Johnson PR. Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 659-669.
- 5 Fisher KJ *et al.* Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 1997; **3**: 306-312.
- 6 Klein RL *et al.* Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol* 1998; **150**: 183-194.

- 7 Peel AL *et al.* Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther* 1997; **4**: 16-24.
- 8 Flannery JG *et al.* Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 6916-6921.
- 9 Lewin AS *et al.* Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 1998; **4**: 967-971.
- 10 Snyder RO *et al.* Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997; **16**: 270-276.
- 11 Merten OW, Geny-Fiamma C, Douar AMj. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* 2005; **12 Suppl 1**: S51-61.
- 12 Wistuba A *et al.* Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 1997; **71**: 1341-1352.
- 13 Schlehofer JR, Ehrbar M, zur Hausen H. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 1986; **152**: 110-117.
- 14 Weindler FW, Heilbronn R. A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* 1991; **65**: 2476-2483.
- 15 McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 1985; **147**: 217-222.
- 16 Gao GP *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 11854-11859.
- 17 Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 1998; **72**: 309-319.
- 18 Gao G *et al.* Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004; **78**: 6381-6388.
- 19 Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004; **330**: 375-383.
- 20 Tratschin JD, Miller IL, Carter BJ. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 1984; **51**: 611-619.
- 21 Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 1983; **45**: 555-564.
- 22 Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 5808-5812.
- 23 Horer M *et al.* Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J Virol* 1995; **69**: 5485-5496.
- 24 Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* 1997; **71**: 1079-1088.
- 25 King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* 2001; **20**: 3282-3291.

- 26 Kotin RM *et al.* Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 2211-2215.
- 27 Samulski RJ *et al.* Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 1991; **10**: 3941-3950.
- 28 Bertran J *et al.* Recombinant adeno-associated virus-mediated high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors. *J Virol* 1996; **70**: 6759-6766.
- 29 Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* 2000; **74**: 9451-9463.
- 30 Duan D *et al.* Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 1998; **72**: 8568-8577.
- 31 Yang J *et al.* Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* 1999; **73**: 9468-9477.
- 32 Lieber Aj. AAV display--homing in on the target. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 1011-1013.
- 33 Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC, Samulski RJ. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 181-186.
- 34 Girod A *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; **5**: 1052-1056.
- 35 Denby L, Nicklin SA, Baker AHj. Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* 2005; **12**: 1534-1538.
- 36 Erles K, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; **59**: 406-411.
- 37 Sun JY, Anand-Jawa V, Chatterjee S, Wong KK. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther* 2003; **10**: 964-976.
- 38 Le HT, Yu QC, Wilson JM, Croyle MA. Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *J Control Release* 2005; **108**: 161-177.
- 39 Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 1998; **72**: 1438-1445.
- 40 Zolotukhin S *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1999; **6**: 973-985.
- 41 Dass CR, Walker TL, Burton MA. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency. *Drug Deliv* 2002; **9**: 11-18.
- 42 Zentilin L, Marcello A, Giacca Mj. Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *J Virol* 2001; **75**: 12279-12287.
- 43 Faller DV, Baltimore Dj. Liposome encapsulation of retrovirus allows efficient superinfection of resistant cell lines. *J Virol* 1984; **49**: 269-272.
- 44 Mizuno M, Yoshida Jj. Improvement of transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus vector by entrapment in multilamellar liposomes. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 352-354.

-
- 45 Philip R *et al.* Efficient and sustained gene expression in primary T lymphocytes and primary and cultured tumor cells mediated by adeno-associated virus plasmid DNA complexed to cationic liposomes. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 2411-2418.
- 46 Wilson T, Papahadjopoulos D, Taber Rj. Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vesicles: antibody resistance and infectivity in virus-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 3471-3475.
- 47 Herzer S, Beckett P, Moore P. Isoelectric titration curves of viral particles as an evaluation tool for ion exchange chromatography. *Life science news*. Amersham Biosciences, 2003.
- 48 Duan D *et al.* Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1573-1587.
- 49 Hansen J, Qing K, Srivastava A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* 2001; **75**: 4080-4090.
- 50 Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2000; **74**: 2777-2785.
- 51 Alexander IE, Russell DW, Miller AD. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1994; **68**: 8282-8287.
- 52 Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996; **70**: 3227-3234.
- 53 Yamamoto C, Deng X, Fujiwara Y, Kaji T. Proteoglycans Predominantly Synthesized by Human Brain Microvascular Endothelial Cells in Culture are Perlecan and Biglycan. *Journal of health science* 2005; **51**: 576-583.
- 54 Pajusola K *et al.* Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells. *J Virol* 2002; **76**: 11530-11540.
- 55 Mounkes LC *et al.* Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26164-26170.
- 56 Bueth D. Hybrid vectors for gene expression in rodent brain. *Journal of Undergraduate Research* 2002; **3**.
- 57 Baker AH, Kritz A, Work LM, Nicklin SAj. Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature. *Exp Physiol* 2005; **90**: 27-31.

CAPÍTULO 5

Entrega específica de vectores adenovirais a células endoteliais activadas mediada por lipossomas direccionados

5.1. Introdução

Os resultados apresentados no capítulo anterior desta dissertação indicam que a aplicação de protocolos de terapia génica em células endoteliais, mediada por vectores virais adeno-associados encapsulados em nanotransportadores direccionados, parece encontrar-se limitada pela falta de permissividade destas células face à transdução mediada pelos referidos vectores.

Na tentativa de ultrapassar essa limitação, optou-se por substituir os vectores adeno-associados por vectores adenovirais, conforme descrito no presente capítulo.

Os adenovírus são vírus sem envelope, que contêm uma molécula de ADN linear de cadeia dupla, com 36000 pares de bases (Figura 5.1). A cápside é um icosaedro com vinte faces constituídas por estruturas hexaméricas, e doze vértices, cada um ocupado por uma unidade estrutural designada por pentâmero. O pentâmero é constituído por uma fibra e por uma base pentâmero¹.

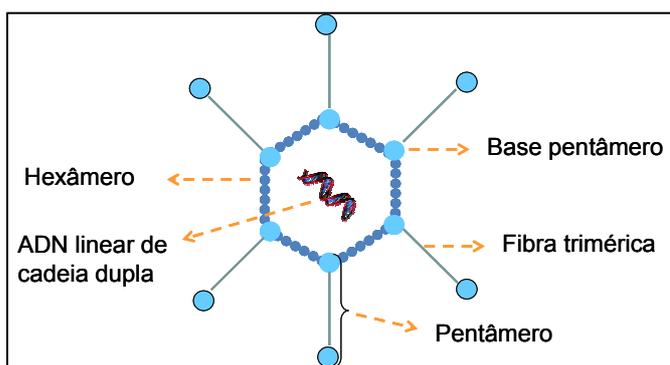


Figura 5.1- Esquema da estrutura de adenovírus

Os adenovírus mais utilizados em terapia génica (tipo 2 e tipo 5) utilizam como receptor celular primário o CAR (receptor de coxackievírus e de adenovírus). A maioria dos adenovírus liga-se a este receptor por intermédio do terminal carboxílico da fibra do pentâmero². Após estabelecimento desta ligação, os motivos RGD da base pentâmero, interagem com integrinas α_v das células hospedeiras desencadeando o processo endocítico³. Após internalização, os adenovírus escapam do endossoma e são translocados através do complexo do poro nuclear para o núcleo da célula, onde o ADN viral é liberto. A transcrição, a replicação e o empacamento viral decorrem no núcleo da célula infectada. Os genes são transcritos a partir de ambas as cadeias de ADN, e a transcrição decorre em duas fases: uma fase precoce e uma fase tardia, as quais ocorrem

antes e após a replicação viral, respectivamente. As regiões inicialmente transcritas correspondem aos locais E1, E2, E3 e E4, sendo que os produtos do gene E1 estão directamente envolvidos na replicação. A região E2 fornece os elementos para a replicação do ADN e também para a transcrição de genes tardios⁴. A maioria das proteínas E3 está envolvida na modulação da resposta imunitária das células infectadas⁵. A região E4 codifica produtos designados *opening reading frames (ORFs) 1-6/7*, os quais estão envolvidos no metabolismo das moléculas de ARN dos vírus; desempenham ainda a função de bloquear a síntese proteica da célula hospedeira. Por outro lado, os genes tardios estão envolvidos na produção de proteínas estruturais, as quais por sua vez estão envolvidas na formação das partículas virais, na última fase do ciclo de infecção viral⁴.

Os adenovírus, à semelhança de outros vírus, foram adaptados de modo a poderem ser utilizados como ferramentas em terapia génica, sendo por isso designados de vectores adenovirais, ou adenovírus recombinantes (rAd). No âmbito desta dissertação foram utilizados vectores adenovirais com deleção na região E1, o que previne, pelo menos parcialmente, a replicação viral e a consequente lise celular. Estes vectores, designados de 1^a geração, podem apresentar também uma deleção na região E3 conjuntamente com a deleção da região E1. Os vectores de 2^a geração, para além da deleção E1 ou da deleção E1 e E3, apresentam deleções nas regiões E2 e/ou E4. A 3^a geração de adenovírus recombinantes, também designados por adenovírus de alta capacidade, é caracterizada pela eliminação de todo o genoma viral, com excepção da sequência responsável pelo empacamento dos vírus e das repetições terminais invertidas (ITR)⁶.

Os vectores adenovirais têm demonstrado ser eficientes na transdução de diferentes tipos de células, entre as quais as células endoteliais, ao contrário do que foi já demonstrado para o ADN plasmídico e para os vectores adeno-associados (ver Capítulos 3 e 4 da presente dissertação). Outras vantagens atribuídas aos vectores adenovirais incluem a possibilidade de poderem ser produzidos com títulos elevados e de permitirem a clonagem de fragmentos de ADN de elevado tamanho. Uma vantagem adicional da sua utilização em terapia génica consiste na ausência de transmissão às células da linhagem germinal⁷.

Actualmente, são duas as principais limitações associadas a estes vectores, quando se considera a sua administração sistémica visando a entrega de genes direccionada a células endoteliais activadas. Uma dessas limitações é o tropismo para outras células,

em detrimento das células alvo, o que é em parte devido à dispersão da expressão do receptor CAR. Esta característica pode resultar não só em transdução não produtiva, como também em efeitos secundários causados pela expressão do transgene noutras células que não as células alvo⁸. Com efeito, após administração em modelo murínico, grande parte dos vectores localizam-se a nível hepático, levando à sua rápida eliminação, o que se relaciona com outra limitação dos vectores adenovirais: a resposta imune inata e adaptativa⁹. Por um lado, a administração de doses elevadas destes vectores induz toxicidade, como consequência da activação da resposta imune inata. Por outro lado, a possibilidade de readministrar vectores adenovirais encontra-se limitada pela imunidade adaptativa do hospedeiro, a qual se desenvolve rapidamente após exposição às proteínas virais da cápside. Neste contexto, importa referir que a maioria da população humana já teve contacto com adenovírus e portanto possui anticorpos contra estes vectores¹⁰.

Têm sido desenvolvidas estratégias para circunscrever alguns dos problemas referidos, as quais se baseiam na eliminação das interacções anteriores e no redireccionamento dos vectores para células que não expressam CAR. Uma dessas estratégias consistiu na complexação ou encapsulação dos vectores adenovirais em lipossomas catiónicos. Alguns dos estudos realizados demonstraram que os lipossomas catiónicos apresentam a capacidade de promover a transdução mediada pelos vectores adenovirais e de protegê-los de anticorpos preexistentes¹⁰⁻¹⁵. Contudo, o excesso de carga positiva conferida pelos lipossomas referidos torna-os inapropriados para administração intravenosa, uma vez que as cargas positivas medeiam interacções não específicas com proteínas séricas e células sanguíneas e endoteliais¹⁶⁻¹⁸. Outras estratégias utilizadas, consistiram no acoplamento directo de polímeros como o PEG, seguido do acoplamento de um ligando,¹⁹⁻²³ ou pela interacção com moléculas bi-específicas^{8,24-26}, tendo-se ainda testado o redireccionamento de vectores adenovirais por manipulação genética²⁷⁻³⁰. Todas estas estratégias demonstraram um efeito positivo na promoção da interacção com células endoteliais. Dos trabalhos referidos, apenas dois tiveram como objectivo a entrega mediada pela E-selectina. Harari e colaboradores desenvolveram um complexo entre adenovírus recombinantes e um anticorpo anti E-selectina (1.2B6)²⁴, demonstrando selectividade na entrega e expressão do transgene em segmentos de aorta de porco, previamente incubados com um mediador inflamatório. Ogawara e colaboradores desenvolveram um outro método em que o acoplamento de PEG heterofuncional aos adenovírus é seguido pelo acoplamento do anticorpo anti- E-

selectina (H18/7) a uma extremidade do PEG²². Este sistema dirigiu selectivamente os vectores para regiões de pele de ratinho previamente inflamada, após administração intravenosa.

A manipulação genética tem-se apresentado como abordagem de sucesso apenas na incorporação de alguns peptídeos pequenos nas fibras de Ad₅ e, à semelhança das estratégias de acoplamento de polímeros ou de moléculas bi-específicas, apresenta o problema da protecção incompleta conferida à cápside. Deste modo, é bastante provável que algumas das proteínas virais expostas promovam interacções não específicas com células e desencadeiem uma resposta por parte do sistema imunitário.

As limitações referidas constituíram um estímulo ao desenvolvimento de novos métodos de entrega direccionada de vectores adenovirais para células endoteliais activadas, conferindo-lhes também características que permitam a administração sistémica. A estratégia que a seguir se apresenta consiste na encapsulação de vectores adenovirais em nanovesículas lipídicas de carga negativa. A superfície das nanovesículas foi depois modificada para melhorar a farmacocinética e conferir direccionamento, através da inserção de moléculas de PEG e do acoplamento do ligando para a E-selectina, respectivamente (Figura 5.2).

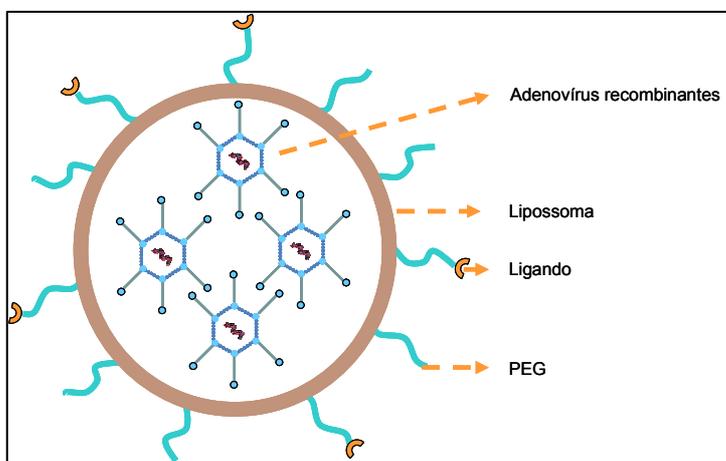


Figura 5.2- Esquema da estrutura de adenovírus recombinantes, encapsulados em imunolipossomas

Espera-se que uma formulação com estas características permita mascarar completamente os vectores virais, minimizando a resposta imune inata contra as proteínas da cápside, protegendo ainda de anticorpos preexistentes contra estas proteínas virais, à semelhança do que já foi demonstrado com os lipossomas catiónicos. No desenvolvimento da formulação colocou-se também a hipótese de que a resposta

imune adaptativa poderia ser atenuada pelo facto dos vectores se encontrarem menos expostos aos linfócitos B. Por outro lado, a carga negativa dos lipossomas aqui desenvolvidos, por oposição aos exemplos apresentados, deverá permitir minimizar interacções não específicas com células sanguíneas.

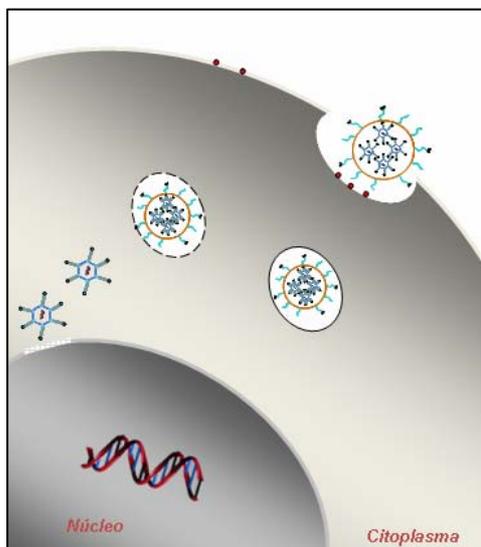


Figura 5.3- Esquema da internalização de adenovírus recombinantes mediada por imunolipossomas em células endoteliais activadas

Neste capítulo pretende-se avaliar se a formulação desenvolvida apresenta direccionamento eficiente para células endoteliais activadas e capacidade de libertação dos adenovírus no espaço intracelular (Figura 5.3), mantendo simultaneamente características favoráveis à administração intravenosa.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Produção de vectores adenovirais

Os vectores adenovirais foram produzidos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Centro de Biotecnologia Animal e Terapia Génica, da Escola de Medicina Veterinária, da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha.

O vector adenoviral com deleção do gene E1 foi produzido e posteriormente purificado em tampão HEPES/sacarose pH 8,0, de acordo com o método convencional do gradiente duplo de cloreto de céσιο. Os vectores produzidos correspondem aos

serotipos 2 e 5, e contêm os genes da proteína β -galactosidase (LacZ) ou da proteína verde fluorescente (GFP), respectivamente, sob o controlo do promotor do citomegalovírus (pCMV).

5.2.2. Produção do anticorpo H18/7

O anticorpo H18/7 foi produzido e purificado conforme descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 3 desta dissertação.

5.2.3. Preparação de imunolipossomas contendo vectores adenovirais e imunolipossomas vazios

O filme lipídico, composto por PI/EPC/DOPE/CHOL na razão molar 3/2/3/2 ou por EPC/DOPE/CHOL na razão molar 5/3/2, foi preparado por evaporação do clorofórmio da mistura lipídica recorrendo a um fluxo de azoto. De seguida, o filme lipídico foi hidratado com uma solução aquosa contendo os vectores adenovirais, de modo a obter uma concentração total de lípido de 4,5 mM e uma concentração de vectores adenovirais de $1,75 \times 10^{11}$, $3,5 \times 10^{11}$ ou de $1,75 \times 10^{12}$ unidades infecciosas/mL.

Os lipossomas multilamelares resultantes foram extrudidos por membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm. Os adenovírus recombinantes não encapsulados foram separados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο.

Após remoção dos vectores adenovirais não encapsulados procedeu-se à quantificação do colesterol utilizando o *kit* Infinity Cholesterol Reagent. O PEG heterofuncional foi incubado com os lipossomas numa razão de 5 mg de NHS-PEG-Mal por mg de colesterol, de modo a que o éster N-hidroxisuccinimida (NHS) reaja com as aminas primárias do lípido DOPE. A reacção decorreu durante 2 horas, a uma temperatura de 4 °C, sob agitação suave e em atmosfera de azoto. As moléculas de NHS-PEG-Mal que não reagiram foram removidas por cromatografia de exclusão molecular, recorrendo a uma coluna de Sefarose CL-4B. A eluição foi realizada com HBS a pH 7,2 contendo EDTA numa concentração de 2 mM. A activação do anticorpo foi efectuada conforme descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 3 desta dissertação. O anticorpo activado foi incubado com os lipossomas numa razão de 0,375 mg por μ mol de lípido total, por um período de 2 ou 12 horas, a 4 °C ou à temperatura ambiente, dependendo do protocolo experimental, mas sempre sob agitação suave e em

atmosfera de azoto. Após este período, os grupos maleimida ainda activos foram desactivados com β -mercaptoetanol numa razão molar de 1 mol PEG por 5 mol de β -mercaptoetanol. O anticorpo não acoplado e o excesso de β -mercaptoetanol foram removidos por eluição em coluna de Sefarose CL-4B utilizando um tampão de HBS a pH 7,4.

Os imunolipossomas vazios foram preparados por um método semelhante, com a excepção da hidratação do filme lipídico, a qual foi efectuada com HBS a pH 8, na ausência de vectores adenovirais. Consequentemente, também não se aplicou o passo de remoção de vectores virais não encapsulados pelo gradiente de cloreto de cézio. A extrusão foi efectuada por membranas com diâmetro de poro de 200 ou de 400 nm.

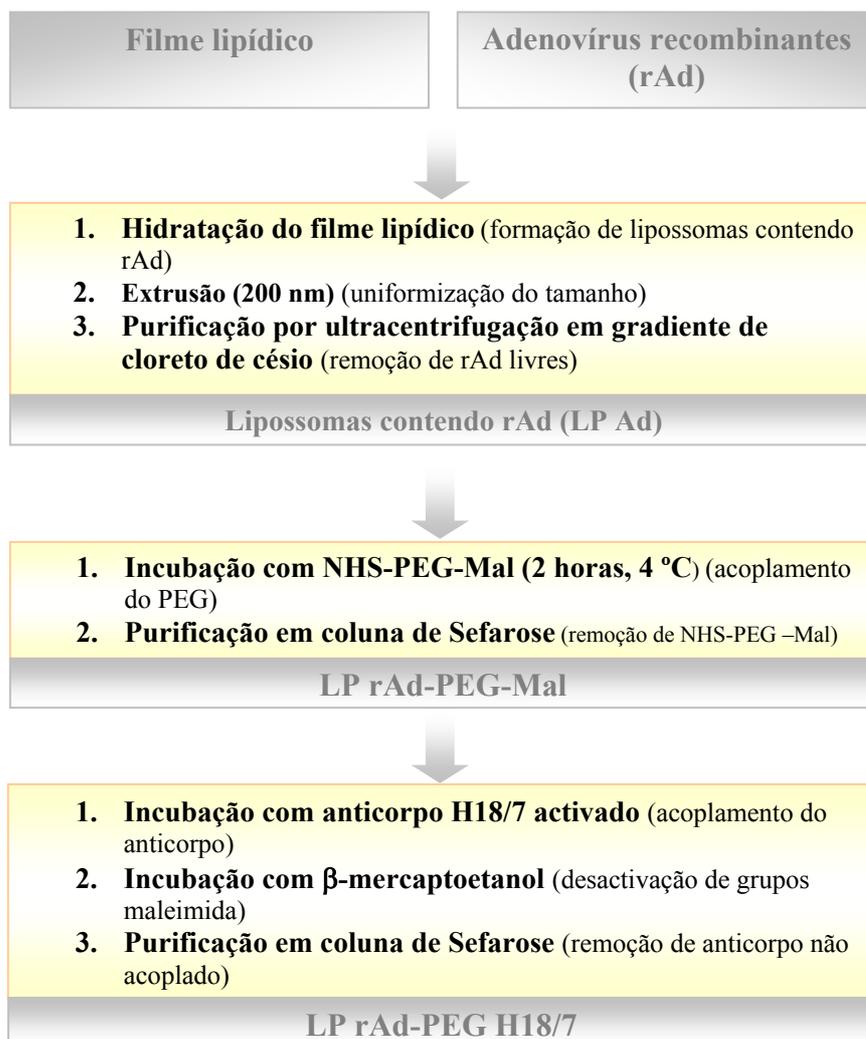
5.2.3.1. Purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAd por gradientes de Ficoll e de cloreto de cézio

O gradiente de cloreto de cézio foi preparado utilizando duas soluções de cloreto de cézio (Sigma) com massas volúmicas de 1,41 e 1,27 kg/l, tendo-se pipetado 1,5 mL da solução de massa volúmica 1,41 kg/l, e 2,5 mL da solução de massa volúmica 1,27 kg/l. No topo, como última camada, colocaram-se 0,5 mL de lipossomas. No caso particular, em que se analisou a eficiência deste gradiente para remoção de vectores não encapsulados em lipossomas, a última camada consistiu numa solução de HBS contendo adenovírus recombinantes (5×10^7 unidades infecciosas de Ad₅pCMVGFP). O gradiente de cloreto de cézio foi sujeito a ultracentrifugação a 155000 g durante 2 horas, a 18 °C. A determinação do número de unidades infecciosas por camada foi efectuada após diálise em PBS, utilizando uma membrana apresentando um valor de *cut off* de 8000 Da (Spectrum). As células endoteliais HUVEC foram incubadas com soluções correspondentes às diversas fracções, as quais foram previamente diluídas em série. Após 48 horas, o número de células positivas para cada diluição foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur), e com base nesses resultados determinou-se o número de unidades infecciosas por unidade de volume.

O gradiente de Ficoll também foi inicialmente considerado para separação de adenovírus recombinantes (Ad₂pCMVLacZ). Este gradiente foi preparado com uma primeira camada composta por 1 mL de Ficoll a 30 % misturado com 0,5 mL de formulação ou de adenovírus livres (2×10^{10} genomas), seguido de 3 mL de Ficoll a 10 %, e uma última camada de 0,5 mL de HBS a pH 7,4. A ultracentrifugação foi realizada

a 72000 g durante 30 minutos, a 4 °C, e a concentração de genomas virais em cada camada foi determinada por PCR, tal como referido na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 4.

Assim, após os estudos de optimização, a preparação de imunolipossomas contendo rAd passou a ser efectuada de acordo com o esquema de seguida apresentado.



5.2.4. Efeito das condições experimentais na viabilidade dos vectores e avaliação da cinética da perda de actividade

Para determinar o efeito das condições experimentais na actividade dos vectores adenovirais do tipo 2 (pCMVLacZ) em células endoteliais HUVEC, estas foram incubadas com vectores sujeitos a condições de luz e temperatura idênticas às utilizadas na preparação dos imunolipossomas, numa concentração de 8000 unidades

infecciosas por célula (Ad₂pCMVLacZ). Paralelamente, as células foram incubadas com rAd descongelados imediatamente antes da adição às células.

Para avaliar a perda de actividade dos rAd ao longo do tempo após diluição com PBS (1/10) (A) ou após diluição (1/10) seguido de eluição por coluna de Sefadex G50 (B), os adenovírus recombinantes foram deixados a 4 °C durante períodos de tempo definidos, até serem incubados com as células: 50000 unidades infecciosas por célula na situação (A) e 32000 unidades infecciosas por célula na situação (B).

Nas situações supra referidas, a incubação com as células foi realizada por um período de 48 horas, após o qual estas foram lavadas e lisadas, antes de proceder à quantificação da β-galactosidase.

5.2.5. Preparação de misturas de adenovírus recombinantes/imunolipossomas

Os complexos foram preparados por mistura de imunolipossomas ou lipossomas sem ligando, de 200 nm de diâmetro, com adenovírus recombinantes, de modo a obter uma concentração final de lípido de 76 μM e uma concentração final de adenovírus recombinantes de 4×10^9 unidades infecciosas/mL. Com o objectivo de promover a interacção entre os lipossomas carregados negativamente e os adenovírus recombinantes, o pH da solução contendo os adenovírus foi ajustado a 4,5, tendo-se demonstrado previamente que este abaixamento de pH não lhes altera a capacidade de transduzir células HUVEC. Deste modo, as proteínas da superfície viral passam a apresentar carga positiva, favorecendo a interacção com os lipossomas de carga negativa. As células, semeadas na densidade de 10000 por poço, em placas de 24 poços, foram incubadas com os complexos de modo a obter uma concentração final de lípido de 7,6 μM e 20000 unidades infecciosas por célula.

5.2.6. Caracterização dos lipossomas

5.2.6.1. Determinação do tamanho

O tamanho dos imunolipossomas, diluídos em HBS a pH 7,4, foi medido por espectroscopia de correlação fotónica, num aparelho designado PCS Submicron Particle Size Analyser (Beckman Coulter). As medições foram realizadas a 25 °C, com um

tempo de equilíbrio de 5 minutos, durante 200 segundos e com um ângulo de leitura a 90°.

5.2.6.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada com base na concentração de genomas de adenovírus, determinada por PCR quantitativo, e na concentração de colesterol, determinada utilizando o *kit* Infinity Cholesterol Reagent, à semelhança do referido para a determinação da eficiência de encapsulação de rAAV, referido na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 4.

5.2.6.3. Eficiência de acoplamento do ligando

Nas experiências de optimização efectuadas com a transferrina, a eficiência de acoplamento deste ligando foi determinada pela razão entre a massa de transferrina por mol de colesterol final e a massa de transferrina por mol de colesterol inicial (EA).

5.2.7. Estudos de associação celular

Os estudos de associação celular foram realizados por citometria de fluxo e por microscopia confocal. Os pormenores relativos à cultura celular das células HUVEC encontram-se descritos na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 3.

Nos estudos realizados por citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços, previamente revestidos com gelatina a 1 %, com uma densidade de 10000 células por poço, 24 horas antes da incubação com os lipossomas. Os imunolipossomas ou lipossomas não direccionados, contendo adenovírus recombinantes (LP Ad-H18/7 ou LP Ad-PEG) ou não (LP-H18/7 ou LP-PEG), foram incubados com as células endoteliais HUVEC numa concentração de 80 μ M de lípido total, durante 4 horas a 37 °C, na presença ou ausência de TNF- α (100 ng/mL), previamente incubado com as células durante 1 hora. Os imunolipossomas desprovidos de vectores virais foram preparados por extrusão através de membranas com diâmetro de poro de 200 ou 400 nm, conforme indicado.

Nos estudos de microscopia confocal, as células foram semeadas em lâminas de 8 poços, previamente revestidos com 1 % de gelatina, na densidade de 10000 células por poço. Nas experiências de microscopia confocal utilizaram-se protocolos diferentes no caso de lipossomas desprovidos de adenovírus (vazios) e no caso de lipossomas

contendo adenovírus. Assim, os estudos de associação de lipossomas vazios (400 nm) foram realizados incubando LP-H18/7 ou LP-PEG com células endoteliais HUVEC na concentração de 80 μM em lípido, durante 4 horas a 37 °C, na presença ou ausência de TNF- α (100 ng/mL), previamente incubado com as células durante 1 hora. Nos estudos de associação celular, os lipossomas contendo vectores adenovirais (LP Ad- H18/7 ou LP Ad- PEG), foram incubados com as células endoteliais HUVEC na concentração de 40 μM em lípido. Para activar as células, o TNF- α foi previamente incubado com as estas durante 4 horas na concentração de 100 ng/mL. Subsequentemente, as células foram lavadas e incubadas com as formulações durante 1 hora, às temperaturas de 4 °C ou 37 °C.

5.2.8. Estudos de transdução

As experiências de transdução foram realizadas recorrendo a citometria de fluxo e microscopia confocal.

Nos estudos de citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram semeadas numa placa de 24 poços, na densidade de 10000 células por poço, 24 horas antes da experiência de transdução. Os lipossomas, LP Ad-H18/7 ou LP Ad-PEG, foram incubados com as células endoteliais HUVEC nas concentrações de 40 μM ou 80 μM em lípido. A incubação foi realizada por um período de 12 horas a 37°C, na presença ou ausência de TNF- α na concentração de 100 ng/mL . Nos estudos de inibição da transfecção, as células foram pré-incubadas durante 30 minutos com H18/7 (20 $\mu\text{g/mL}$), após 4 horas de incubação com TNF- α . Os lipossomas foram então incubados com as células por 1 hora, ainda na presença de E-selectina. Após este período, as células foram lavadas e incubadas durante mais 48 horas antes de realizar as experiências de citometria de fluxo.

Para os estudos de microscopia confocal, o procedimento seguido foi semelhante com a diferença do plaqueamento das células, o qual foi realizado conforme descrito na subsecção 5.2.7.

Todas as experiências foram realizadas na presença de soro fetal de bovino não desactivado, a 20 %.

5.2.9. Avaliação da associação celular e da expressão do transgene

Nos estudos de citometria de fluxo, as células endoteliais HUVEC foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com uma solução de tripsina/EDTA até se destacarem das placas e imediatamente ressuspensas em PBS contendo 20 % de soro. Após centrifugação, foram novamente ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo para determinação das células positivas para GFP. Para os estudos de transdução celular os lipossomas foram marcadas com Rh- PE para evitar interferência com a leitura da fluorescência da GFP, e para a análise da associação celular os lipossomas foram marcados com Fluor-PE uma vez que o aparelho de citometria de fluxo não permitia a análise da Rh-PE.

Para os estudos por microscopia confocal, as células foram lavadas com PBS e fixadas com PFA a 4 %, a 4 °C durante 15 minutos. O excesso de PFA foi desactivado com solução de glicina na concentração de 0,1 M, e as células foram lavadas com PBS, e preparadas com meio de montagem VectaShield contendo DAPI, apropriado para a análise de amostras que apresentam fluorescência. Os lipossomas preparados para os estudos de transdução foram marcados com Rh-PE pela razão já referida acima, e os lipossomas preparados para os estudos de associação celular foram marcadas tanto com Rh-PE como com Fluor-PE, utilizando para tal um microscópio confocal LSM 510 (Zeiss).

Em alguns casos particulares, em que se utilizou o Ad2 pCMVLacZ, a transdução foi determinada com base no método já descrito na secção “Materiais e métodos” do Capítulo 2.

5.2.10. Viabilidade celular

Nove horas após a remoção do meio contendo os imunolipossomas, as células foram incubadas com uma solução de resazurina (Sigma), durante 12 horas. A referida solução de resazurina foi preparada a 10 % (v/v) em meio de cultura, partindo de uma solução de concentração 0,1 mg/mL.

Após o período de incubação, o meio foi analisado por ELISA a 540 nm, utilizando o filtro de 630 nm como referência. Após correcção correspondente ao branco (poços contendo solução de resazurina na ausência de células), os valores

obtidos foram expressos em termos percentuais relativamente à condição controlo (células quiescentes incubadas com lipossomas não direccionados).

5.3. Resultados

5.3.1. Avaliação de factores críticos na preparação de lipossomas

5.3.1.1. Processos de purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAd

Com o objectivo de remover os adenovírus não encapsulados, foram testados dois métodos de separação baseados em gradiente (Figura 5.4). O gradiente de Ficoll tem sido utilizado em formulações lipossómicas para remover ADN plasmídico não encapsulado³¹. Os resultados obtidos demonstram, contudo, que este método não é muito eficiente quando aplicado a vectores adenovirais. Após ultracentrifugação de uma solução contendo rAd, detectaram-se 33 % ($\pm 0,4$) de genomas virais na fase de HBS, a fase correspondente à fracção lipossómica quando o processo de purificação é aplicado aos lipossomas (Figura 5.4 A).

O método do cloreto de cézio, desenvolvido para purificar adenovírus dos resíduos das células onde estes foram produzidos, originou um perfil de separação mais eficiente. O número de unidades infecciosas detectadas na fase de HBS após aplicação deste processo a uma solução contendo rAd, corresponde a 3,2 % ($\pm 4,1$), enquanto que 94,5 % ($\pm 0,8$) do número total de unidades infecciosas existentes no gradiente se encontra na interface entre as soluções de cloreto de cézio com densidades de 1,41 e 1,27 (Figura 5.4 B). Este resultados são indicativos claros de que este último método é o mais adequado para remover vectores adenovirais não encapsulados de um mistura contendo vectores livres e encapsulados em lipossomas.

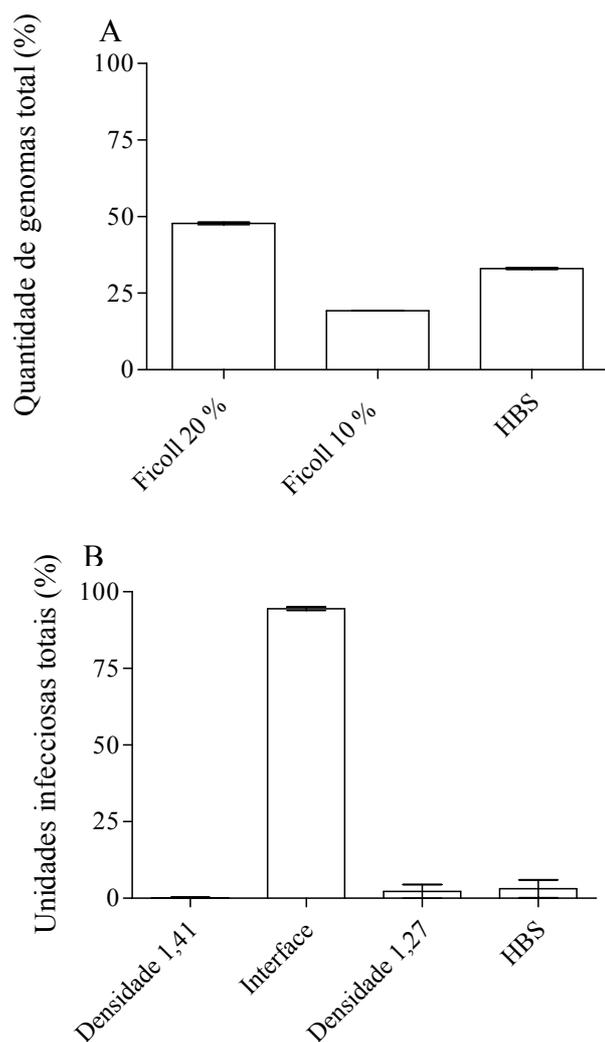


Figura 5.4- Purificação de lipossomas direccionados encapsulando rAd por gradiente de Ficoll e gradiente de cloreto de céσιο

Os vectores adenovirais foram diluídos em PBS e a sua distribuição nas diferentes camadas foi determinada após ultracentrifugação. A quantificação dos vírus foi efectuada por quantificação dos genomas virais (Ad₂pCMVLacZ) por PCR quantitativo no caso do gradiente de Ficoll (A), ou por determinação do número de partículas infecciosas (Ad₅pCMVGFP) no caso do gradiente de cloreto de céσιο (B).

i. Efeito do cloreto de céσιο no acoplamento do ligando

Considerando os resultados promissores da separação de adenovírus recombinantes em gradiente de cloreto de céσιο, tornou-se necessário demonstrar que este sal, devido à elevada viscosidade que confere à solução que contém os lipossomas, não interfere com o acoplamento da molécula de PEG à superfície destes. Como tal, avaliou-se a extensão da associação celular de imunolipossomas vazios, cujo método de preparação implicou a utilização do gradiente de cloreto de céσιο. Os resultados de associação celular obtidos com imunolipossomas preparados por este processo, são

similares aos observados para imunolipossomas vazios, preparados na ausência de cloreto de céσιο, com 78 % das células activadas incubadas com os imunolipossomas a apresentar valores de intensidade de fluorescência muito elevados (Figura 5.5). Este resultado indica que a composição do gradiente não condiciona a eficácia do acoplamento do PEG, e consequentemente do ligando, aos lipossomas.

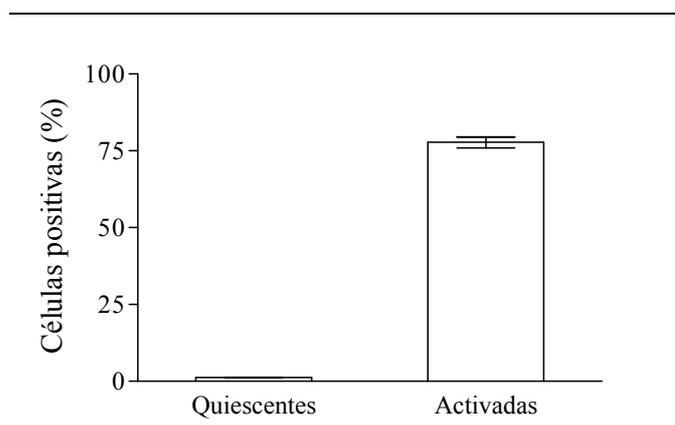


Figura 5.5- Influência do cloreto de céσιο na eficiência de acoplamento do PEG e do ligando H18/7

Os lipossomas vazios, marcados com Fluor-PE, preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm, foram sujeitos a um gradiente de cloreto de céσιο. Após ultracentrifugação, os lipossomas foram removidos e incubados com PEG heterofuncional durante 2 horas. Após remoção do PEG não acoplado e incubação do ligando, os lipossomas foram incubados com células HUVEC activadas, na concentração de 80 μ M em lípido, durante 4 horas. A activação das células com TNF- α , na concentração de 100 ng/mL, teve início uma hora antes da incubação com os lipossomas e prosseguiu durante as 4 horas de incubação. Após esse período, as células foram lavadas, e o número de células positivas para a associação de lípido foi determinado por citometria de fluxo. Os valores apresentados foram determinados definindo como valor basal a fluorescência de células quiescentes incubadas com imunolipossomas de 200 nm.

5.3.1.2. Condições de acoplamento: efeito da temperatura e do tempo pós descongelação

O protocolo de preparação de imunolipossomas inicialmente utilizado implicava que os vectores adenovirais ficassem expostos à temperatura ambiente até cerca de 72 horas, após descongelação, antes de serem incubados com as células a transduzir. Os resultados obtidos com o vector Ad₂LacZ demonstram, contudo, que nestas condições os vírus recombinantes perdem a capacidade de transduzir células (Figura 5.6).

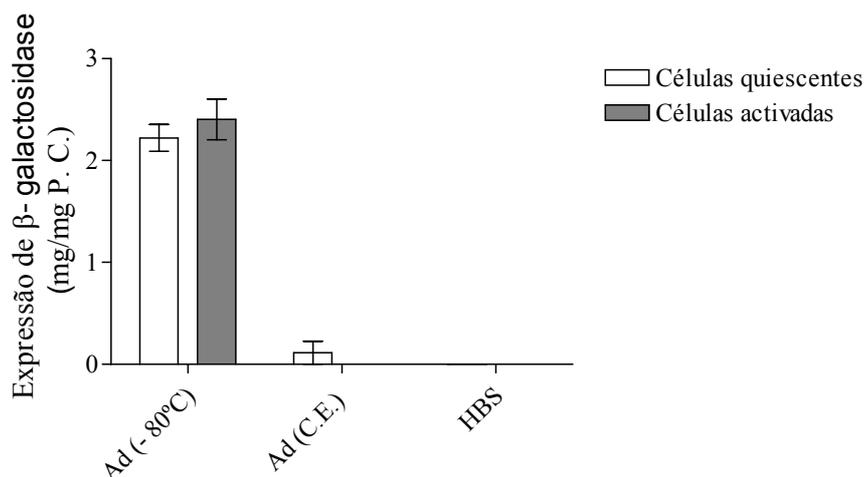


Figura 5.6- Efeito das condições experimentais na viabilidade dos vectores

As células endoteliais HUVEC foram incubadas com os vectores adenovirais numa concentração de 8000 unidades infecciosas por célula ($Ad_2pCMVLacZ$). Os vectores adenovirais foram sujeitos às mesmas condições experimentais de preparação dos imunolipossomas (Ad C.E.) ou descongelados imediatamente antes da adição às células (Ad -80 °C). A incubação com as células foi realizada por um período de 48 horas, após o qual estas foram lavadas e lisadas, antes de proceder à quantificação da β -galactosidase.

Uma explicação possível para esse efeito seria a presença prejudicial de glicerol nos *stocks* adenovirais. Por esse motivo, efectuou-se um estudo sobre a cinética da perda de actividade de transdução após descongelação. Nesse estudo, os *stocks* de adenovírus foram diluídos em PBS (Figura 5.7 A) ou eluídos numa coluna de Sefadex G50 (Figura 5.7 B), na tentativa de diluir ou remover o glicerol por cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. Após este tratamento, os adenovírus foram mantidos a 4 °C, por períodos determinados, até serem incubados com as células a transduzir. Os resultados revelam que, mesmo após a tentativa de remoção ou diluição do glicerol, continua a observar-se uma perda rápida da actividade de transdução. Seis horas após descongelação os complexos apresentam em média apenas 20 % da sua actividade inicial. Após 80 horas, o que corresponde aproximadamente ao período de preparação dos imunolipossomas, a actividade dos vectores encontra-se reduzida a 1,5 % da sua actividade inicial.

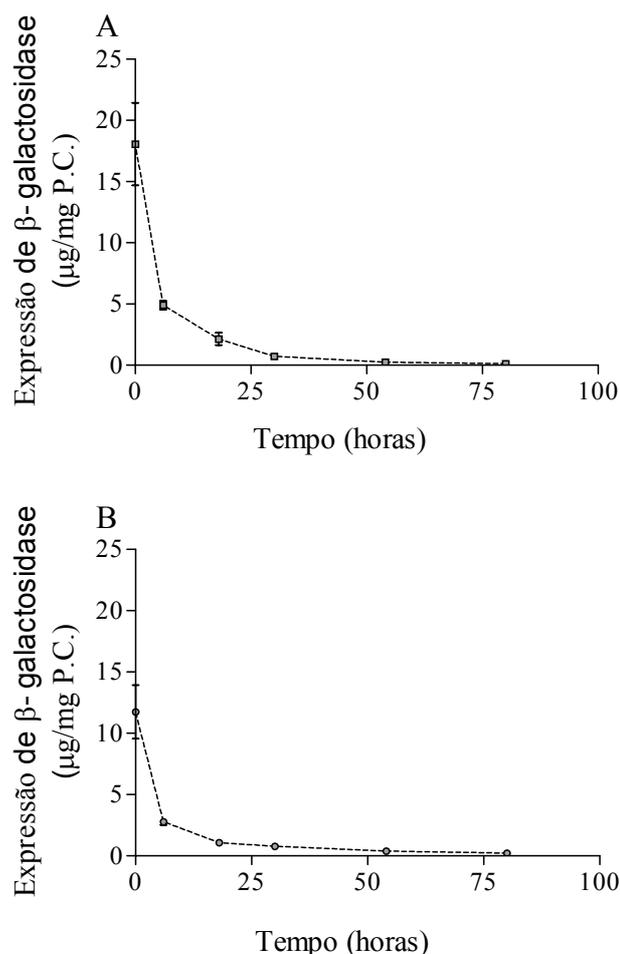


Figura 5.7- Estudo da cinética da perda de actividade dos adenovírus em função do tempo após descongelação

Os adenovírus ($\text{Ad}_2\text{pCMVLacZ}$) foram descongelados e diluídos 1/10 com PBS (A) ou diluídos 1/10 e sujeitos a uma centrifugação por coluna de Sefadex G50 (B). Os adenovírus recombinantes foram deixados a 4 °C durante períodos de tempo definidos, até serem incubados com as células: 50000 unidades infecciosas por célula na situação (A) e 32000 unidades infecciosas por célula na situação (B). A incubação com as células foi realizada por um período de 48 horas, após o qual as células foram lavadas e lisadas, antes de proceder à quantificação da β -galactosidase.

A análise efectuada com um outro serotipo de adenovírus, Ad_5GFP , revelou uma vantagem acrescida. O serotipo em causa demonstrou ser mais resistente após descongelação e os resultados obtidos demonstram que 24 horas após este processo, este serotipo, se mantido a 4 °C, preserva a sua capacidade de transdução. Contudo, se mantido à temperatura ambiente, a sua actividade é completamente abolida. Os resultados sugerem que, ou os vectores do serotipo 5 são mais resistentes após descongelação do que os vectores de serotipo 2, ou que os *stocks* foram preparados com quantidades diferentes de glicerol, favorecendo a viabilidade de um *stock* em detrimento

do outro. Estes resultados constituíram uma forte indicação de que, para o prosseguimento da tarefa, é imperativo alterar a temperatura de trabalho para 4 °C, e minimizar o tempo total de preparação da formulação.

No seguimento dos resultados de perda de actividade do adenovírus recombinantes, procedeu-se à avaliação do efeito da temperatura na eficiência de acoplamento do ligando aos lipossomas (Tabela 5.1). Tratando-se de estudos de optimização experimental, optou-se por utilizar como ligando uma proteína modelo, a transferrina, visando uma utilização mais racional do anticorpo. A primeira abordagem consistiu em avaliar o efeito da temperatura (temperatura ambiente *versus* 4 °C) no processo de acoplamento, tanto da molécula de NHS-PEG-Mal aos lipossomas, como do ligando ao grupo NHS da molécula de PEG. A eficiência de acoplamento manteve-se igual, independentemente da temperatura a que se efectuou o processo de acoplamento (0,011). Este resultado indica que é possível alterar a temperatura, sem influenciar a eficiência do processo. Adicionalmente, foi também demonstrado que a diminuição do tempo de incubação do ligando com o conjugado PEG-lipossomas de 12 para 2 horas não influenciou os níveis de ligação da transferrina (0,014). No seu conjunto, estes resultados demonstram que é possível diminuir a temperatura e o tempo de incubação do acoplamento.

Condições	Temp ambiente 12 horas	4°C 12 horas	4°C 2 horas
EA	0,011	0,011	0,014

Tabela 5.1- Influência da temperatura e do tempo de reacção na eficiência de acoplamento do ligando

O processo de acoplamento do ligando transferrina, decorreu durante 12 horas à temperatura ambiente ou a 4 °C, e também a 4 °C durante 2 horas. O processo de acoplamento do PEG heterofuncional decorreu durante 2 horas, variando apenas a temperatura de acordo com as condições utilizadas para o acoplamento da transferrina. Após remoção de ligando não acoplado, procedeu-se à quantificação de colesterol e transferrina na amostra final, tendo-se efectuado igualmente estas quantificações na amostra inicial, determinando-se com base nesses valores a eficiência de acoplamento (EA).

5.3.1.3. Método de preparação por mistura de lipossomas pré-formados

Uma das alternativas avaliadas para resolver o problema detectado, consistiu em preparar complexos resultantes da mistura de quantidades precisas de adenovírus recombinantes com imunolipossomas vazios (Figura 5.8). Os complexos foram

preparados de modo a obter uma concentração final de lípido de 76 μM e 4×10^9 unidades infecciosas/mL. Com o objectivo de promover a interacção entre os lipossomas carregados negativamente e os adenovírus recombinantes, o pH da solução contendo os adenovírus foi mantido a valores de 4,5. Deste modo, e de acordo com alguns dados disponíveis na literatura³², as proteínas de superfície passam a apresentar carga positiva, favorecendo a interacção com os lipossomas de carga negativa. As células foram incubadas com complexos na concentração de 7,6 μM de lípido total e 20000 unidades infecciosas por célula. Apesar de se observarem diferenças relativamente à eficiência de transdução mediada por imunolipossomas, com um efeito mais marcado em células endoteliais activadas, em todas as outras condições também se verificaram elevados níveis de expressão do transgene. Por esse motivo esta estratégia foi abandonada.

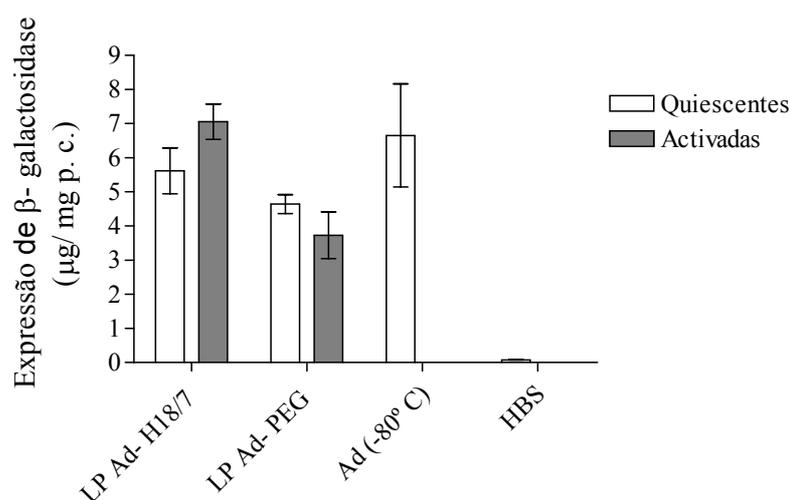


Figura 5.8- Transdução de células HUVEC mediada por complexos de adenovírus/imunolipossomas

Imunolipossomas vazios marcados com Fluor-PE foram preparados por extrusão através de membranas com diâmetro de poro de 200 nm, e misturados com adenovírus ($\text{Ad}_{2p}\text{CMVLacZ}$) a pH 4,5 (Lp Ad-H18/7). As mesmas condições experimentais foram aplicadas aos lipossomas não direccionadas (Lp Ad-PEG). As células activadas ou quiescentes foram incubadas com os complexos na concentração de 7,6 μM em lípido total e 20000 unidades infecciosas por célula. A activação das células teve início uma hora antes da incubação dos lipossomas com $\text{TNF-}\alpha$ na concentração de 100 ng/mL, e prosseguiu durante as 4 horas de incubação dos lipossomas. A incubação com as células foi realizada por um período de 48 horas, após o qual as células foram lavadas e lisadas, antes de proceder à quantificação da β -galactosidase.

5.3.2. Transdução de células endoteliais activadas mediada por imunolipossomas com 200 nm de diâmetro

Identificadas as variáveis críticas no processo de produção dos imunolipossomas contendo vectores adenovirais, procedeu-se à avaliação da transdução. Iniciou-se por determinar a influência do tamanho dos imunolipossomas e da encapsulação dos vectores adenovirais, no perfil de associação celular. Finalmente, realizaram-se estudos de transdução, onde se avaliou o efeito da composição lipídica dos imunolipossomas e da concentração inicial dos vectores adenovirais nos níveis e especificidade da transdução. Avaliou-se também o efeito da dose inicial dos imunolipossomas nos níveis de transdução e a influência da formulação na viabilidade das células transduzidas.

5.3.2.1. Estudos de associação celular

i. Efeito do tamanho dos imunolipossomas

Apesar dos resultados de associação celular, determinados por citometria de fluxo, apresentados no Capítulo 3, terem evidenciado não existir um efeito do tamanho dos imunolipossomas na extensão da associação celular (Figura 5.9 A), as respectivas imagens de microscopia confocal revelam que a fluorescência das células incubadas com lipossomas de 400 nm se concentra principalmente a nível da membrana celular, sem que ocorra internalização significativa de lipossomas (Figura 5.9 B).

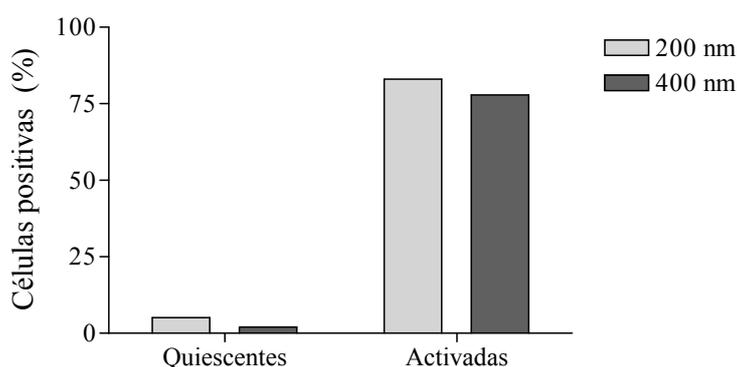


Figura 5.9 A- Extensão da associação celular de imunolipossomas de 200 e 400 nm

As células activadas ou quiescentes foram incubadas durante 4 horas, com imunolipossomas vazios, na concentração de 80 μ M, extrudidos através de membranas com diâmetro de poro de 200 ou 400 nm, e marcados com Fluor-PE. A activação das células teve início uma hora antes da incubação dos lipossomas com TNF- α na concentração de 100 ng/mL, e prosseguiu durante as 4 horas de incubação dos lipossomas. Após esse período, as células foram lavadas, e o número de células positivas para a associação de lipido foi determinada por citometria de fluxo.

Os valores apresentados foram determinados definindo como valor basal, a fluorescência de células quiescentes incubadas com imunolipossomas de 200 nm.

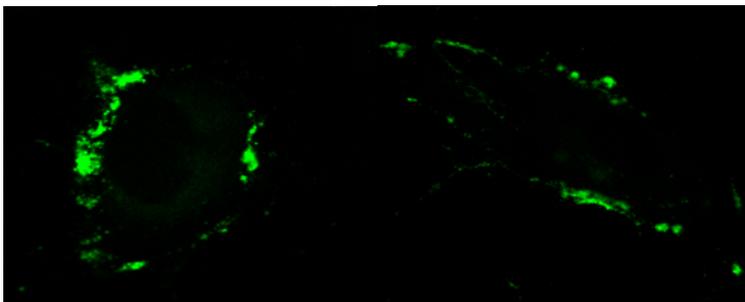


Figura 5.9 B- Associação celular mediada por imunolipossomas vazios de 400 nm

Os imunolipossomas vazios, marcados com Fluor-PE, foram extrudidos através de membranas com poro de diâmetro 400 nm, e incubados 4 horas com células HUVEC activadas, numa concentração de 80 μ M em lípido. A activação das células teve início uma hora antes da incubação dos lipossomas com TNF- α na concentração de 100 ng/mL e prosseguiu durante as 4 horas de incubação dos lipossomas. As células foram depois lavadas, fixadas, preparadas com meio de montagem e analisadas por microscopia confocal utilizando uma objectiva de óleo *Plan-Apochromat* 63 \times /1.4.

Uma vez que este perfil de associação poderá comprometer a eficiência da entrega de genes às células alvo, optou-se pela utilização de lipossomas com aproximadamente 200 nm de diâmetro médio. Os resultados de PCS indicam que o tamanho dos imunolipossomas extrudidos através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm é de 185,2 nm (\pm 9,4), encontrando-se descrito que partículas com este tamanho poderão ser internalizadas através de endocitose mediada por receptores³³.

ii. Efeito dos adenovírus encapsulados

O perfil de associação celular de lipossomas de 200 nm, contendo vectores adenovirais, é equivalente ao perfil de associação de lipossomas vazios. À semelhança do efectuado para lipossomas vazios, o valor de fluorescência considerado basal foi definido a partir de experiências realizadas envolvendo a incubação de lipossomas não direccionados (com células quiescentes ou activadas) e de imunolipossomas incubados com células quiescentes. Este valor basal corresponde a um valor de fluorescência de 3160 unidades, e engloba tanto os valores de fluorescência referentes a células não incubadas com lipossomas (0 a 75 unidades de fluorescência) como os referentes às condições anteriormente citadas (75 a 3160 unidades de fluorescência). Estes resultados indicam que, mesmo na ausência de direccionamento, se verifica, embora em baixa extensão, associação de lipossomas às células. Contudo, quando os imunolipossomas

foram incubados com células endoteliais activadas, 78 % das células apresentam uma fluorescência superior a 3160 unidades de intensidade de fluorescência, indicando uma forte interacção dos imunolipossomas com as respectivas células alvo (Figura 5.10 A).

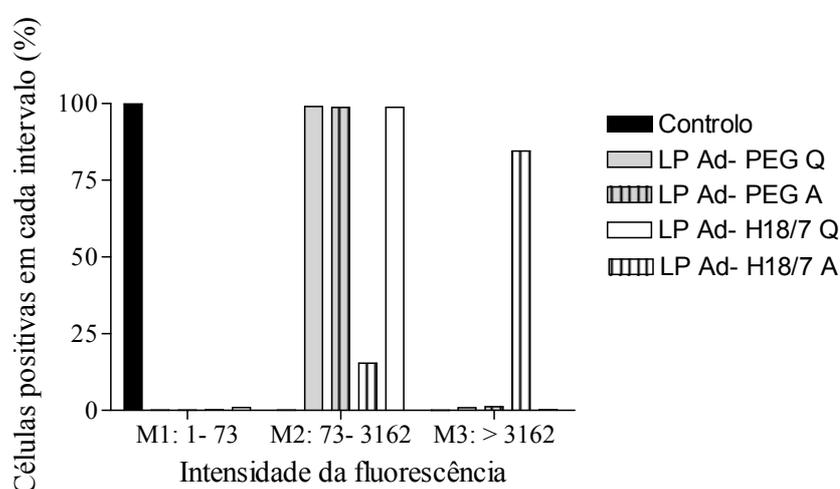


Figura 5.10 A- Associação celular mediada por imunolipossomas contendo vectores adenovirais

Os imunolipossomas marcados com Fluor-PE e contendo Ad₅pCMVGFP, preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm, foram incubados com células HUVEC activadas (LP Ad- H18/7 A) e quiescentes (LP Ad- H18/7 Q), durante 4 horas, na concentração de 80 μ M, em lípido. Os lipossomas não direccionados foram incubados com células activadas (LP Ad- PEG A) e com células quiescentes (LP Ad- PEG Q) nas mesmas condições. A condição controlo diz respeito a células incubadas com tampão. A activação das células com TNF- α , na concentração de 100 ng/mL, teve início uma hora antes da incubação com os lipossomas e prosseguiu durante as 4 horas de incubação. Após esse período, as células foram lavadas, e o número de células positivas para a associação de lípido foi determinada por citometria de fluxo. A percentagem de células positivas em cada condição foi determinada para os três intervalos de intensidade definidos.

A especificidade da interacção celular foi confirmada por microscopia confocal. Para além de confirmarem os resultados obtidos por citometria de fluxo, as imagens de microscopia demonstram ainda que a fluorescência detectada se deve não só à ligação dos imunolipossomas à membrana citoplasmática, mas também à internalização pelas células (Figura 5.10 B), ao contrário do observado com os imunolipossomas de 400 nm (Figura 5.9B).

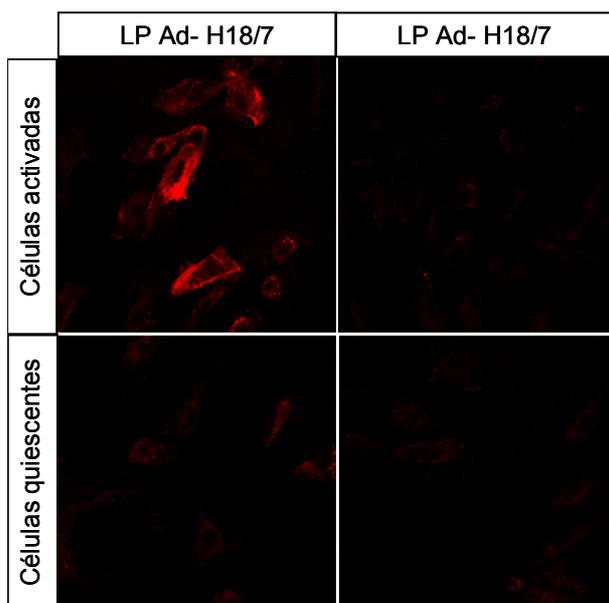


Figura 5.10 B – Associação celular de lipossomas contendo vectores adenovirais encapsulados

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP, preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm, foram incubados com as células HUVEC activadas ou quiescentes (LP Ad- H18/7), na concentração de 40 μ M de lípido total, durante 1 hora. Os lipossomas controlo foram incubados com células activadas ou quiescentes (LP Ad- PEG), nas mesmas condições. A activação das células HUVEC foi realizada por incubação com TNF- α na concentração de 100 ng/mL durante 4 horas, antes da incubação com os lipossomas. Após incubação dos lipossomas, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal, utilizando uma objectiva Pan-Neofluar 40 \times /0.75.

5.3.2.2. Estudos de transdução

i. Efeito da composição dos lipossomas

De modo a otimizar as condições de transdução, testaram-se várias condições, incluindo a composição dos lipossomas. Conforme justificado anteriormente, os lipossomas de carga positiva não foram considerados devido às interacções não específicas que medeiam, considerando-se apenas lipossomas que se apresentem neutros ou carregados negativamente a pH 7,4.

A encapsulação foi testada utilizando um filme lipídico, constituído por PI/EPC/DOPE/CHOL, em que a carga negativa é conferida pelo PI, e com um filme lipídico sem lípidos negativos, constituído por EPC/DOPE/CHOL. A hidratação do filme lipídico neutro foi contudo difícil, ao contrário da hidratação do filme contendo PI, processo que não foi favorecido por variações do pH da solução de hidratação,

verificando-se que apenas a diminuição acentuada da concentração de lípido permitiu a formação dos lipossomas.

Por este motivo, optou-se por prosseguir o trabalho com a formulação de PI/EPC/DOPE/CHOL.

ii. Efeito da concentração inicial de vectores adenovirais

A avaliação dos níveis de transdução mediada por imunolipossomas encapsulando vectores adenovirais foi realizada utilizando como ponto de partida duas concentrações iniciais de adenovírus recombinantes. Utilizando a concentração inicial de $1,75 \times 10^{11}$ ui/mL, os resultados obtidos demonstram que a transdução ocorreu selectivamente em células endoteliais activadas, correspondendo aproximadamente a 20 % de células transduzidas. Aumentando dez vezes a concentração inicial dos vectores, a percentagem de células transduzidas aumentou, mas parte desse aumento foi devido a efeitos não específicos (Figura 5.11). É possível que nestas condições, o protocolo estipulado para a purificação com o gradiente de cloreto de cézio não permita a separação tão eficaz de vectores adenovirais livres, o que terá como consequência a sua acumulação na formulação final. A verificar-se esta hipótese, estes vectores adenovirais livres tenderiam a mediar interacções não específicas com as células, e consequente transdução não selectiva. Estes resultados sugerem que a concentração inicial de $1,75 \times 10^{11}$, constitui uma base de trabalho para experiências futuras.

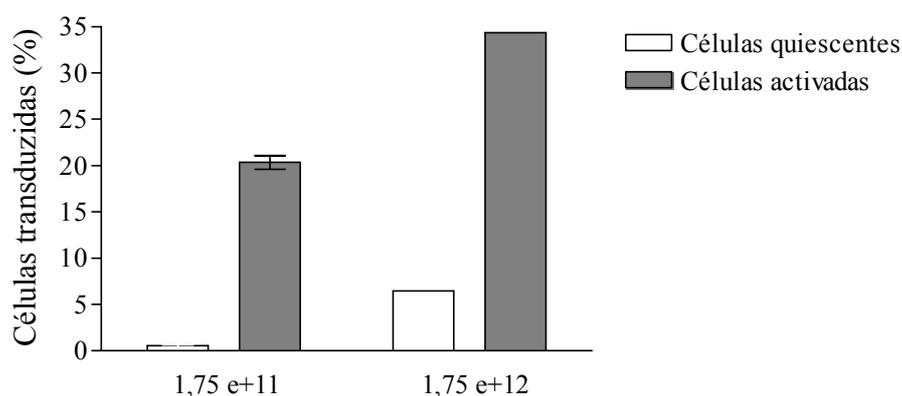


Figura 5.11- Eficiência de transdução mediada por imunolipossomas em função da concentração inicial de adenovírus

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE foram preparados a partir de uma concentração inicial de Ad₅pCMVGFP de $1,75 \times 10^{11}$ ou de $1,75 \times 10^{12}$ ui/mL e por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm, e incubados com células activadas ou quiescentes, na concentração de 80 μ M em lípido total. Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas durante mais 36 horas. Após

essa incubação, as células foram lavadas, destacadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados foram determinados definindo os valores da fluorescência de células incubadas com HBS como a fluorescência basal.

iii. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada por PCR quantitativo em lipossomas contendo adenovírus do tipo 2, observando-se uma variação dos valores da eficiência de encapsulação entre 1 a 4 %. Estes valores, apesar de considerados baixos, correspondem ao valor esperado, uma vez que o processo de encapsulação é passivo, e portanto menos eficiente. A utilização de estratégias que usualmente promovem a encapsulação de compostos, tal como o congelamento/descongelamento, é desaconselhável uma vez que promovem a perda da actividade dos vírus. Para além do referido, não existem factores que promovam a interacção entre os lipossomas e os adenovírus recombinantes, uma vez que ambos possuem carga negativa ao pH a que decorre a preparação. Apesar dos valores de eficiência de encapsulação serem baixos, o elevado título inicial das preparações de adenovírus permitem uma encapsulação significativa de partículas virais em lipossomas, conferindo-lhes capacidade de transdução.

5.3.2.3. Estabelecimento da curva dose/resposta

Após identificação das condições mais favoráveis à transdução específica mediada por imunolipossomas, procedeu-se ao estabelecimento da curva dose/resposta da formulação.

Os imunolipossomas desenvolvidos transduzem especificamente células endoteliais activadas, sendo que a incubação de células no estado quiescente com imunolipossomas resultou em níveis de transdução pouco significativos. O mesmo é válido para lipossomas não direccionados incubados tanto com células endoteliais quiescentes, como com células endoteliais activadas. No seu conjunto, estes resultados estão em consonância com os níveis de associação celular previamente descritos. Os resultados obtidos permitem concluir que os níveis de transdução observados em células endoteliais activadas, após tratamento com imunolipossomas, são dependentes da dose inicial de imunolipossomas (Figura 5.12 A). O aumento da concentração de imunolipossomas com a qual as células são incubadas resulta num aumento do número de células transduzidas, até se atingir um *plateau* de 34,25 %, para uma concentração de lípido de 32 μM . Para concentrações superiores não se verificou um aumento significativo do número de células que expressam o transgene. A análise estatística,

efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0143 após comparação dos valores correspondentes à expressão da GFP mediada por imunolipossomas (LP Ad-H18/7) em células activadas e em células quiescentes, especificamente na condição correspondente à incubação com lipossomas na concentração em lípido de 64 nmol.

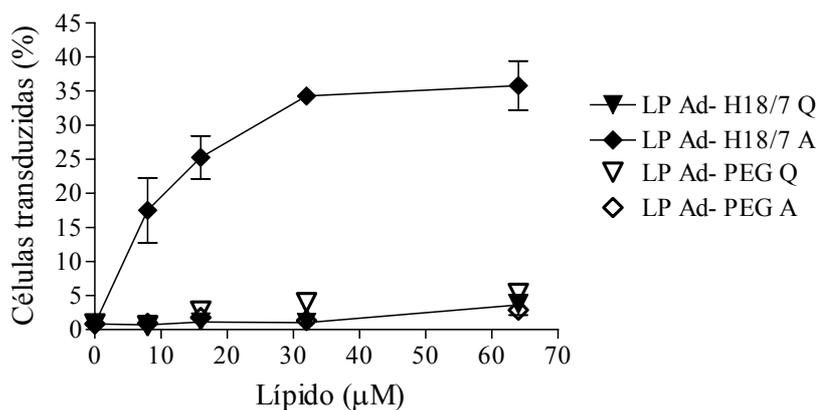


Figura 5.12 A - Eficiência de transdução mediada por quantidades crescentes de imunolipossomas.

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE foram preparados a partir de uma concentração inicial de Ad₅pCMVGFP de $3,75 \times 10^{11}$ ui/ mL e por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm. Os lipossomas foram incubados com células activadas (LP Ad-H18/7 A) ou quiescentes (LP Ad-H18/7 Q), em concentrações variáveis de lípido total. O mesmo se aplicou a lipossomas controlo não direccionados (LP Ad-PEG A e LP Ad-PEG Q). Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas por mais 36 horas. Após essa incubação, as células foram lavadas, destacadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados foram determinados definindo o valor da fluorescência de células incubadas com HBS como a fluorescência basal. A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0143 após comparação dos valores correspondentes à expressão da GFP mediada por imunolipossomas (LP Ad-H18/7) em células activadas e em células quiescentes, especificamente na condição correspondente à incubação com lipossomas na concentração em lípido de 64 nmol.

A observação das células endoteliais por microscopia confocal confirmou a especificidade na entrega de genes e consequente transdução em células endoteliais activadas (Figura 5.12 B).

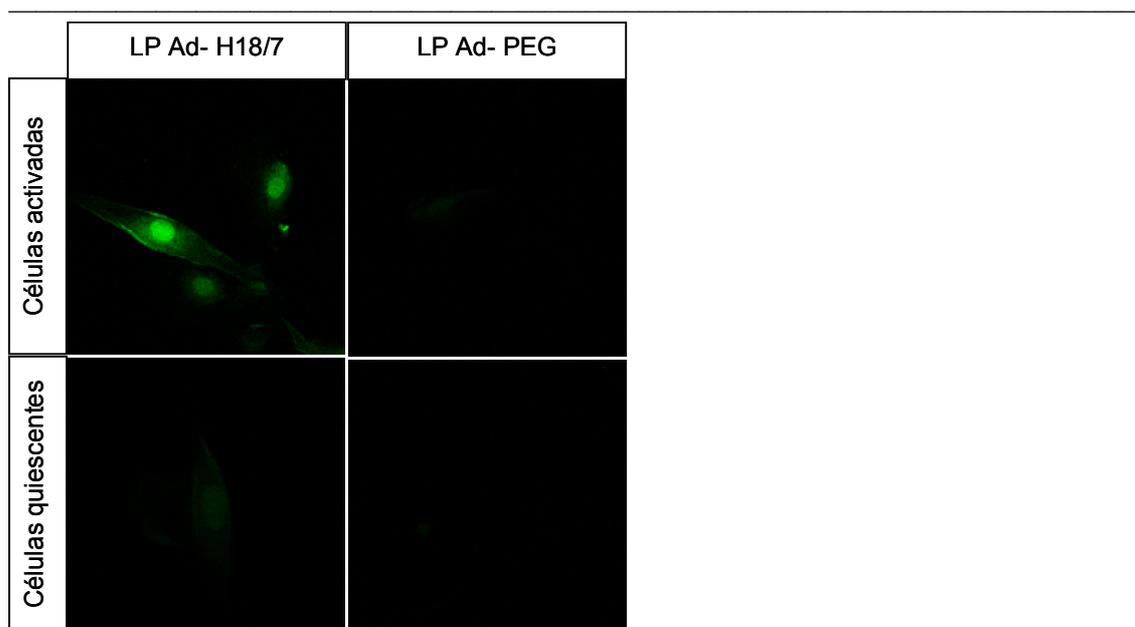


Figura 5.12 B- Análise da eficiência de transdução por microscopia confocal

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE foram preparados a partir de uma concentração inicial de Ad₅pCMVGFP de $3,75 \times 10^{11}$ ui/mL e por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm. Os lipossomas foram incubados com células activadas ou quiescentes na concentração de 40 μ M em lípido total. O mesmo foi aplicado a lipossomas não direccionados. Após 12 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas mais 36 horas. Após essa incubação, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal, utilizando uma objectiva Pan-Neofluar 40 \times /0.75.

5.3.2.4. Avaliação da citotoxicidade

Tal como descrito na secção “Materiais e métodos”, o efeito da formulação desenvolvida na viabilidade celular foi avaliado pelo método da redução da resazurina.

A incubação da resazurina com as células foi iniciada 21 horas após o início da incubação com os lipossomas, e foi realizada durante um período de 12 horas a 37 °C. Após este período, o meio de cultura foi analisado e a percentagem de redução da resazurina foi determinada em relação a uma condição controlo, consistindo na incubação de células quiescentes com lipossomas não direccionados, à qual se atribuiu o valor de 100 % de redução, ou seja, o máximo de viabilidade celular. Os resultados demonstram que, após internalização da formulação de imunolipossomas encapsulando adenovírus, esta induz uma redução da viabilidade celular de aproximadamente 25 % (Figura 5.13).

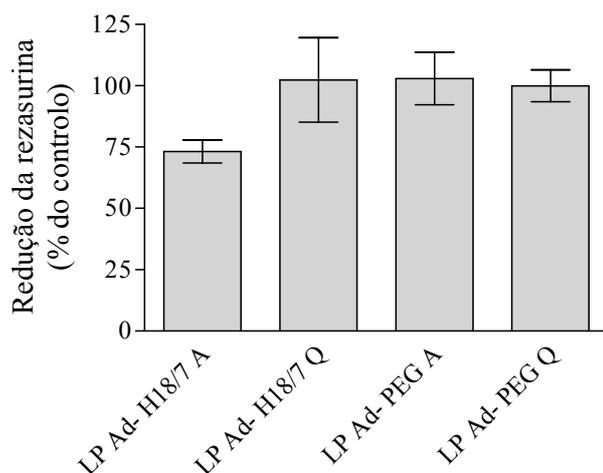


Figura 5.13 – Avaliação da toxicidade celular induzida pelos imunolipossomas

Os imunolipossomas, marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP, foram preparados por extrusão através de membranas de 200 nm de diâmetro de poro e incubados com células HUVEC activadas (LP- H18/7 A), ou quiescentes (LP- H18/7 Q). Os lipossomas controlo (não direccionados), também foram incubados com células activadas (LP- PEG A) e quiescentes (LP- PEG Q). As células foram incubadas com lipossomas na concentração de 40 μ M de lípido total. Após incubação o meio contendo os lipossomas foi removido e 9 horas depois as células foram incubadas com meio contendo resazurina, durante um período de 12 horas. Após este período a absorvância do meio foi lida a 540 nm, utilizando o comprimento de onda de 630 nm como referência. Os valores de absorvância foram normalizados, atribuindo 100 % ao valor das células quiescentes incubadas com imunolipossomas.

A diminuição da viabilidade celular não parece estar relacionada com o mediador inflamatório TNF- α , uma vez que na condição em que as células são incubadas com este composto e com lipossomas não direccionados, não se verifica diminuição da viabilidade celular.

Os resultados também indicam que a toxicidade não é induzida por imunolipossomas não associados às células, uma vez que a incubação destes com células quiescentes também não induziu redução da viabilidade celular. Atendendo aos resultados apresentados, e ao facto de, devido à sua composição, não ser esperada toxicidade por parte de imunolipossomas vazios, é lógico atribuir a toxicidade aos vectores adenovirais internalizados.

5.3.3. Mecanismos celulares envolvidos na entrega direccionada de vectores adenovirais mediada por imunolipossomas

5.3.3.1. Efeito da temperatura na internalização celular dos imunolipossomas

Com o objectivo de desvendar os mecanismos subjacentes à entrega de genes mediada por imunolipossomas a células endoteliais activadas, estas foram incubadas com imunolipossomas durante 1 hora, a 37 ou a 4 °C, após activação com TNF- α (Figura 5.14). Os resultados demonstram claramente que, a 4 °C, os imunolipossomas ficam retidos à superfície das células sem que ocorra internalização, ao contrário do que se observa quando a incubação é realizada a 37 °C. Nestas condições é possível observar lipossomas ligados à superfície celular, mas também uma quantidade significativa de fluorescência citoplasmática, indicação inequívoca da internalização celular da formulação. Estes resultados indicam que a internalização dos imunolipossomas é dependente de energia, sugerindo o envolvimento da via endocítica.

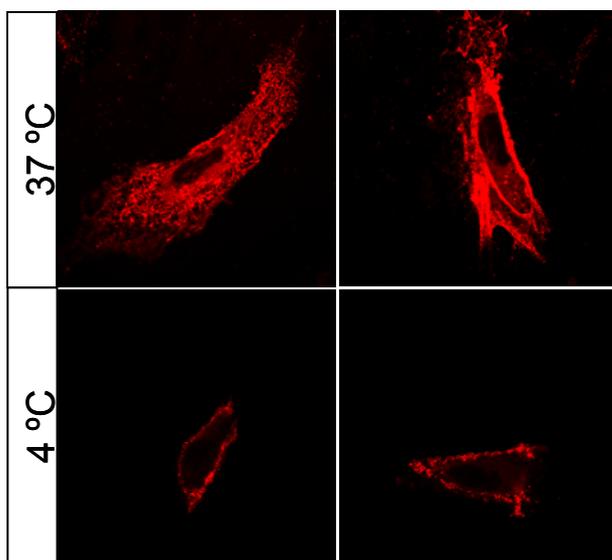


Figura 5.14 - Análise do perfil de associação celular de imunolipossomas contendo vírus recombinantes encapsulados em função da temperatura de incubação

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP foram preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm e incubados na concentração de 40 μ M de lípido total com células HUVEC activadas ou quiescentes (LP- H18/7). A incubação foi realizada durante 1 hora, a 37 °C ou a 4 °C. A activação das células HUVEC foi realizada durante 4 horas antes da incubação com os lipossomas por incubação com TNF- α na concentração de 100 ng/mL. Após incubação com os lipossomas, as células foram lavadas, fixadas e preparadas com meio de montagem para análise por microscopia confocal, utilizando uma objectiva de óleo Plan- Neofluar 100 \times /1.3.

5.3.3.2. Efeito do excesso de H18/7 livre nos níveis de transdução

Os resultados apresentados em secções anteriores sugerem que a internalização dos imunolipossomas é mediada pela E-selectina expressa à superfície de células endoteliais activadas. Para comprovar essa hipótese, células endoteliais previamente activadas foram incubadas com excesso de anticorpo anti-E-selectina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, seguindo-se mais 1 hora de incubação nas mesmas condições, na presença de imunolipossomas. Após um período de 48 horas de incubação, as células foram ressuspensas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstram que o excesso de anticorpo anti- E-selectina foi suficiente para abolir a transdução mediada por imunolipossomas, indicando claramente que a internalização dos imunolipossomas contendo vectores adenovirais está a ser mediada pela E-selectina (Figura 5.15). A análise estatística, efectuada por um teste t para dados não emparelhados, originou um valor de p de 0,0089 após comparação dos valores correspondentes à expressão da GFP mediada por imunolipossomas (LP Ad-H18/7) em células activadas e em células activadas na presença de H18/7 livre.

Numa perspectiva global, estes resultados traduzem a vantagem da estratégia desenvolvida neste trabalho: o direccionamento de vectores adenovirais especificamente para células endoteliais activadas, por uma via de internalização independente do CAR.

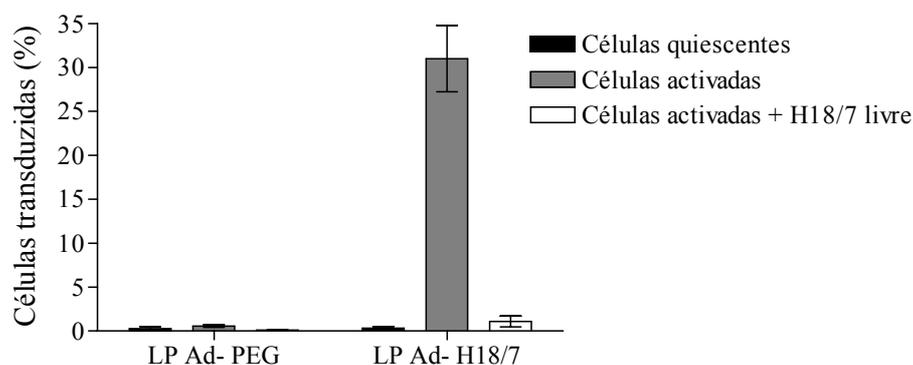


Figura 5.15- Efeito do excesso de ligando na eficiência da transdução

Os imunolipossomas marcados com Rh-PE e contendo Ad₅pCMVGFP foram preparados por extrusão através de membranas com poro de diâmetro de 200 nm e incubados, na concentração de 40 μM em lípido total, com células HUVEC activadas (LP Ad-H18/7 A) ou quiescentes (LP Ad- H18/7 Q), durante 1 hora. Os lipossomas não direccionados foram incubados nas mesmas condições, com células activadas (LP Ad-PEG A) ou quiescentes (LP Ad-PEG Q). As células HUVEC, activadas ou quiescentes, foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo H18/7 na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e subsequentemente com os lipossomas na presença de anticorpo. A activação das células HUVEC foi realizada durante 4 horas antes da incubação com os lipossomas por incubação com TNF- α na concentração de 100 ng/mL. Após 48 horas, as células

foram destacadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados apresentados foram determinados definindo os valores da fluorescência de células incubadas com HBS como a fluorescência basal.

5.4. Discussão

Após identificação e resolução dos principais problemas subjacentes ao desenvolvimento da formulação em causa, foi possível preparar lipossomas com as características adequadas para o direccionamento celular, após administração intravenosa, tanto em termos de tamanho e carga, como em termos de especificidade de interacção celular.

A optimização do processo incluiu a remoção dos vectores adenovirais não encapsulados, factor essencial para que a entrega de genes seja direccionada. A aplicação de técnicas de separação ineficientes promove a existência de vectores livres na formulação final e, como consequência, a entrega de genes poderá ser parcialmente mediada pelo receptor CAR. A remoção de vectores adenovirais não encapsulados foi eficientemente conseguida utilizando um gradiente de cloreto de céσιο, o qual, ao contrário do gradiente de Ficoll, permitiu a acumulação dos vectores numa fase, que não a fase de recolha dos lipossomas. Outra vantagem deste procedimento é a de permitir a recuperação de adenovírus não encapsulados, após diálise da fracção onde se encontram acumulados, possibilitando a sua reutilização. Ainda neste contexto, um outro factor analisado prende-se com a influência do cloreto de céσιο na eficiência do acoplamento da molécula de NHS-PEG-Mal. Apesar dos lipossomas serem recolhidos da fase que contém HBS, verifica-se sempre um certo grau de mistura com a fase de cloreto de céσιο, e como tal, os lipossomas encontram-se numa solução que apresenta alguma viscosidade. De modo a eliminar este parâmetro enquanto factor interferente no processo geral de acoplamento do ligando, imunolipossomas vazios purificados pelo gradiente de cloreto de céσιο foram incubados com as células endoteliais, e a extensão de associação celular foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são reprodutíveis em relação aos observados com imunolipossomas vazios preparados na ausência de cloreto de céσιο, o que permite concluir que esta alteração ao protocolo inicial, também não influenciará negativamente a associação dos imunolipossomas às células endoteliais activadas.

Adicionalmente, realizou-se um estudo com o objectivo de avaliar a resistência dos vectores virais após descongelação, em condições semelhantes às da preparação de imunolipossomas. Este estudo demonstrou que os vectores perdem actividade em função do tempo e da temperatura, resultado que veio colocar em causa a metodologia desenvolvida para a encapsulação e direccionamento dos adenovírus recombinantes. Uma das hipóteses colocadas foi que a presença de glicerol utilizado nos *stocks* de adenovírus fosse o factor responsável pela diminuição da sua capacidade de transdução ao longo do tempo e que, como tal, a remoção deste ou a sua diluição poderiam promover a viabilidade dos vírus. Por esse motivo, realizou-se um estudo da viabilidade ao longo do tempo, em alíquotas de vectores diluídas com PBS, ou submetidas a centrifugação em colunas de Sefadex G 50. Verificou-se que a viabilidade dos vírus decresce rapidamente, sendo portanto de considerar a hipótese de que o glicerol ainda que em menor concentração, continue a exercer um efeito negativo sobre os adenovírus recombinantes. No âmbito deste estudo foi realizada uma experiência semelhante, mas com um serotipo diferente de adenovírus. O rAd₅ analisado contém o gene para a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controlo do promotor do citomegalovírus (pCMV) e, ao contrário do Ad₂pCMVLacZ, demonstrou ser resistente após descongelação. Assim, verificou-se que os vectores virais mantêm praticamente inalterada a sua capacidade de transdução, 24 horas após descongelação. À semelhança do observado para o outro serotipo, a temperatura de trabalho após descongelação é crítica para o processo. Ainda que não completamente conclusivos, os resultados obtidos sugerem que as diferenças observadas não se devem apenas ao serotipo mas também ao efeito da presença do glicerol.

No seu conjunto, estas experiências indicaram a necessidade de desenvolvimento de um método mais rápido de preparação dos imunolipossomas contendo os adenovírus. Uma das aproximações testadas consistiu em obter a formulação por mistura de adenovírus com imunolipossomas previamente preparados. Assim, após 15 minutos de incubação, estas misturas foram adicionados às células previamente activadas. Numa tentativa de tentar favorecer a interacção adenovírus recombinantes/lipossomas, aqueles foram previamente titulados de modo a ajustar os valores de pH a 4,5, garantindo assim a existência de proteínas virais com carga positiva³², para interacção com os lipossomas carregados negativamente. Os resultados ficaram, no entanto, aquém do esperado, uma vez que os níveis de expressão de transgene foram muito elevados nos controlos negativos, indicando que grande parte da transdução foi devida a interacções não

específicas, descontinuando-se como tal esta estratégia. Ainda na perspectiva de otimizar as condições de preparação de imunolipossomas contendo os adenovírus, nomeadamente o tempo total e a temperatura de preparação, avaliou-se o efeito destes parâmetros na eficácia do acoplamento do PEG aos lipossomas, e do ligando à extremidade livre do PEG. Os resultados obtidos demonstraram que alterações nestes parâmetros não afectaram a eficiência de acoplamento, permitindo então reduzir o tempo total de preparação dos imunolipossomas para 14 horas, e a temperatura de acoplamento para 4 °C. Em consonância com os resultados já descritos anteriormente, estas condições salvaguardam a manutenção da actividade dos vectores adenovirais tipo 5.

O tamanho e a estabilidade física das formulações são factores importantes quando se considera a forma de administração intravenosa, dado que apenas partículas sub-micrométricas permitem a circulação sanguínea sem riscos de obstrução de capilares de menor calibre, e por períodos de tempo mais prolongados. Adicionalmente, alterações no tamanho permitem modular a via de internalização celular^{33,34}. Por esse motivo, houve uma preocupação em conciliar o efeito do tamanho com a eficiência de encapsulação e com a actividade biológica das formulações desenvolvidas. Numa fase inicial, considerou-se que a encapsulação de vectores adenovirais, com um diâmetro médio entre 60 e 90 nm, seria favorecida em lipossomas de 400 nm de diâmetro. Neste contexto, os estudos efectuados por outros investigadores não são consensuais relativamente ao tamanho máximo que as partículas devem apresentar para serem internalizadas por endocitose mediada por vesículas com revestimento de clatrina^{33,34}. Contudo, parece haver uma tendência para considerar que partículas de 400 nm já estarão no tamanho limite ou mesmo com tamanho superior ao permitido para serem internalizadas pela referida via, comprometendo desse modo o sucesso da entrega intracelular de genes³³. Apesar dos resultados obtidos por citometria de fluxo terem previamente demonstrado a inexistência de diferenças nos níveis de associação celular mediada por imunolipossomas de 200 e 400 nm, a técnica utilizada reflecte apenas a associação celular, não permitindo discriminar entre ligação e internalização celular. Estudos paralelos realizados por microscopia confocal demonstraram que a fluorescência associada às células incubadas com lipossomas de 400 nm se encontra localizada principalmente na membrana celular. Uma vez que este perfil de associação de lipossomas compromete a eficiência da entrega de genes, optou-se por seleccionar

lipossomas extrudidos por membranas com poros de 200 nm para prosseguir os estudos, apresentando os imunolipossomas assim preparados um tamanho médio de 185 nm.

O padrão de associação celular de imunolipossomas vazios e de imunolipossomas contendo vectores adenovirais é semelhante, sugerindo a inexistência de vectores adsorvidos à superfície dos lipossomas, os quais seriam responsáveis por mediar interacções com o CAR, mascarando o efeito do direccionamento mediado pela E-selectina. A análise por microscopia confocal de células incubadas com imunolipossomas de diferentes tamanhos demonstrou que os imunolipossomas de 200 nm se encontram ligados à membrana celular, mas também são internalizados pelas células, ao contrário do que se verificou com os lipossomas de 400 nm, indicando que esta estratégia é promissora para a entrega intracelular de transgenes a células endoteliais activadas.

A composição lipídica dos lipossomas também constitui um parâmetro importante quando se considera a via de administração intravenosa, uma vez que a presença de cargas positivas, apesar de favorecerem a transdução de vectores adenovirais, também podem mediar interacções não específicas com células, daí as soluções consideradas neste trabalho passarem pela utilização de lipossomas não catiónicos.

Apesar dos baixos valores de encapsulação dos vectores adenovirais, característicos de processo de encapsulação passiva, o elevado título das preparações que caracteriza estes vectores permitiu a encapsulação de um número de partículas virais suficiente, para conferir capacidade de transdução aos imunolipossomas.

Assim, após identificação das condições mais favoráveis à transdução específica mediada por imunolipossomas, procedeu-se ao estabelecimento da curva dose/resposta, a qual foi efectuada tendo como ponto de partida uma razão inicial de adenovírus/lípido previamente determinada. As imagens obtidas por microscopia confocal confirmaram a selectividade da entrega de genes e a consequente transdução das células endoteliais activadas, verificando-se que os baixos níveis de associação celular não específica, previamente observados, não resultaram em expressão significativa do transgene. Importa referir que a percentagem de células em que se verifica associação celular com os imunolipossomas é consideravelmente superior à percentagem de células efectivamente transduzida (78 % *versus* 34 %, respectivamente). Duas hipóteses não mutuamente exclusivas podem ser consideradas para justificar esta observação. A primeira hipótese assenta no facto de a eventual presença de imunolipossomas vazios na preparação poder contribuir para a extensão de associação celular observada e, por outro

lado poder resultar em competição com imunolipossomas contendo vectores adenovirais nos processos de ligação e internalização celular, conduzindo a uma diminuição da expressão de GFP. Outro resultado que suporta esta proposta está relacionado com a observação ao microscópio de células contendo lipossomas associados, mas sem a esperada expressão do transgene. A segunda hipótese reside no facto de as condições experimentais utilizadas, nomeadamente o facto de as células não estarem sincronizadas na mesma fase do ciclo celular³⁵, impedir a quantificação da proteína expressa em todas as células efectivamente transduzidas.

Os estudos de transdução foram realizados incubando os imunolipossomas com as células por um período de 12 horas, na presença de soro fetal de bovino não desactivado. A especificidade da transdução observada nestas condições experimentais é indicativa da estabilidade da formulação em condições próximas das fisiológicas. Caso os lipossomas fossem instáveis na presença de soro contendo proteínas do complemento, teria ocorrido destabilização destes, com a consequente exposição de adenovírus encapsulados, os quais seriam responsáveis pela mediação não selectiva da transdução.

A formulação desenvolvida foi avaliada no que respeita à indução de toxicidade, parâmetro determinado indirectamente, por medida da capacidade redutora das células sujeitas aos diferentes tratamentos. Os resultados de viabilidade celular demonstraram que a formulação, uma vez internalizada, induz alguma toxicidade quando comparada com a observada em condições em que não ocorre internalização. É legítimo considerar que a toxicidade observada resulte dos vírus recombinantes, uma vez que as preparações de vectores da primeira geração se encontram contaminadas com vírus com actividade de replicação, os quais apresentam capacidade de induzir lise celular. Este problema pode ser solucionado pela utilização de células produtoras de vectores que eliminam a produção de vírus com capacidade de replicação.

No que diz respeito aos mecanismos pelos quais os imunolipossomas interagem com as células endoteliais em cultura, a ausência de internalização celular verificada a 4 °C sugere que este processo é dependente de energia, evidenciando o envolvimento da via endocítica. Os estudos de inibição competitiva, realizados por incubação dos imunolipossomas com ligando livre, resultaram numa inibição significativa da transdução celular, indicando claramente que este processo é dependente da internalização dos imunolipossomas mediada pela E-selectina, expressa à superfície das células activadas. A diminuição de 16 vezes verificada nos níveis de transdução nestas

condições reforça a especificidade da formulação, especialmente quando comparada com a redução de apenas 5 vezes obtida por outros autores em abordagens experimentais semelhantes²². Adicionalmente, os resultados das experiências de inibição competitiva obtidos por Harari e colaboradores demonstram que apesar do anticorpo anti-E-selectina na forma livre ter capacidade de diminuir a transdução mediada por vírus conjugados com anticorpo, a presença adicional de anticorpo anti-CAR resulta numa diminuição mais acentuada desta²⁴, sugerindo que a internalização do vector viral continua a ser mediada pelo CAR, ainda que em baixa extensão. Este resultado vem confirmar que, conforme já referido na secção “Introdução”, estas estratégias estão condicionadas pela exposição parcial das proteínas virais, contrariamente ao sistema desenvolvido neste trabalho.

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que se efectua encapsulação de vectores adenovirais em lipossomas, seguido do acoplamento de um ligando para conferir direccionamento específico.

A formulação desenvolvida demonstrou ser eficiente no reconhecimento e entrega de adenovírus recombinantes a células endoteliais activadas, com consequente expressão do transgene transportado, apresentando características adequadas para administração intravenosa, factos que se traduzem no elevado potencial para aplicação em terapia génica, em patologias com envolvimento de células endoteliais. Face a estes resultados, considerou-se estarem reunidas as condições essenciais para iniciar os estudos *in vivo*, assunto investigado no próximo capítulo da dissertação.

5.5. Bibliografia

- 1 Balakireva L, Schoehn G, Thouvenin E, Chroboczek J. Binding of adenovirus capsid to dipalmitoyl phosphatidylcholine provides a novel pathway for virus entry. *J Virol* 2003; **77**: 4858-4866.
- 2 Bergelson JM *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; **275**: 1320-1323.
- 3 Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; **73**: 309-319.
- 4 Clontech. <http://www.clontech.com/support>.
- 5 Burgert HG, Blusch JH. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* 2000; **21**: 13-25.
- 6 Bangari DS, Mittal SK. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther* 2006; **6**: 215-226.

- 7 Paielli DL *et al.* Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity, and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse. *Mol Ther* 2000; **1**: 263-274.
- 8 Volkel T *et al.* Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105). *Biochim Biophys Acta* 2004; **1663**: 158-166.
- 9 Schoggins JW, Nociari M, Philpott N, Falck-Pedersen E. Influence of fiber detargeting on adenovirus-mediated innate and adaptive immune activation. *J Virol* 2005; **79**: 11627-11637.
- 10 Steel JC *et al.* Modification of liposomal concentration in liposome/adenoviral complexes allows significant protection of adenoviral vectors from neutralising antibody, in vitro. *J Virol Methods* 2005; **126**: 31-36.
- 11 Mizuno M, Yoshida J. Improvement of transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus vector by entrapment in multilamellar liposomes. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 352-354.
- 12 Yotnda P *et al.* Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses. *Mol Ther* 2002; **5**: 233-241.
- 13 Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse experimental glioma models. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 825-829.
- 14 Steel JC *et al.* Increased tumor localization and reduced immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DDAB/DOPE. *Eur J Pharm Sci* 2007; **30**: 398-405.
- 15 Steel JC, Cavanagh HM, Burton MA, Kalle WH. Microsphere-liposome complexes protect adenoviral vectors from neutralising antibody without losses in transfection efficiency, in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2004; **56**: 1371-1378.
- 16 Escriou V *et al.* Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1368**: 276-288.
- 17 Merdan T, Kopecek J, Kissel Tj. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 715-758.
- 18 Ogris M *et al.* PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; **6**: 595-605.
- 19 Xiong Z *et al.* Imaging chemically modified adenovirus for targeting tumors expressing integrin alphavbeta3 in living mice with mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase PET reporter gene. *J Nucl Med* 2006; **47**: 130-139.
- 20 Eto Y *et al.* PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* 2005; **7**: 604-612.
- 21 Oh IK, Mok H, Park TG. Folate immobilized and PEGylated adenovirus for retargeting to tumor cells. *Bioconjug Chem* 2006; **17**: 721-727.
- 22 Ogawara K *et al.* A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 433-443.

-
- 23 Ogawara K *et al.* Functional inhibition of NF-kappaB signal transduction in alphavbeta3 integrin expressing endothelial cells by using RGD-PEG-modified adenovirus with a mutant IkappaB gene. *Arthritis Res Ther* 2006; **8**: R32.
- 24 Harari OA *et al.* Targeting an adenoviral gene vector to cytokine-activated vascular endothelium via E-selectin. *Gene Ther* 1999; **6**: 801-807.
- 25 Gupta V *et al.* Fibroblast growth factor-2-retargeted adenoviral vector for selective transduction of primary glioblastoma multiforme endothelial cells. *Neurosurg Focus* 2006; **20**: E26.
- 26 Reynolds PN *et al.* A targetable, injectable adenoviral vector for selective gene delivery to pulmonary endothelium in vivo. *Mol Ther* 2000; **2**: 562-578.
- 27 Xia H, Anderson B, Mao Q, Davidson BLj. Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol* 2000; **74**: 11359-11366.
- 28 Kibbe MR *et al.* Optimizing cardiovascular gene therapy: increased vascular gene transfer with modified adenoviral vectors. *Arch Surg* 2000; **135**: 191-197.
- 29 McDonald GA *et al.* Efficient adenoviral gene transfer to kidney cortical vasculature utilizing a fiber modified vector. *J Gene Med* 1999; **1**: 103-110.
- 30 Hay CM *et al.* Enhanced gene transfer to rabbit jugular veins by an adenovirus containing a cyclic RGD motif in the HI loop of the fiber knob. *J Vasc Res* 2001; **38**: 315-323.
- 31 Dass CR, Walker TL, Burton MA. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency. *Drug Deliv* 2002; **9**: 11-18.
- 32 Herzer S, Beckett P, Moore P. Isoelectric titration curves of viral particles as an evaluation tool for ion exchange chromatography. *Life science news*. Amersham Biosciences, 2003.
- 33 Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra Dj. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; **377**: 159-169.
- 34 Conner SD, Schmid SLj. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; **422**: 37-44.
- 35 Brunner S *et al.* Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 401-407.

CAPÍTULO 6

Avaliação *in vivo* da eficácia de entrega de imunolipossomas contendo adenovírus a células endoteliais activadas

6.1. Introdução

A formulação descrita no capítulo anterior, composta por rAd encapsulados em lipossomas direccionados para células endoteliais activadas, satisfaz os pré-requisitos que foram estabelecidos no início desta dissertação. Nesse sentido, a formulação desenvolvida revelou eficiência de transdução *in vitro*, a qual ocorreu especificamente em células endoteliais activadas, por um processo de internalização mediado pela E-selectina. Paralelamente, a formulação apresenta um conjunto de características consideradas necessárias para a administração intravenosa. Essas características, que incluem o tamanho, a ausência de carga positiva e a presença de PEG à superfície dos lipossomas, são compatíveis com a diminuição de interações não específicas com células e proteínas sanguíneas, como por exemplo a albumina sérica¹, e conferem propriedades farmacocinéticas adequadas aos objectivos terapêuticos, por permitirem aumentar o tempo de meia vida da formulação². Assim, considerou-se estarem reunidas as condições para proceder a uma avaliação preliminar da eficácia *in vivo* da formulação desenvolvida, aferindo adicionalmente a função da encapsulação em imunolipossomas na atenuação da imunogenicidade (desenvolvimento de anticorpos) desencadeada pelos rAd.

Tal como referido no Capítulo 3, a expressão da glicoproteína E-selectina pelas células endoteliais, após activação por mediadores inflamatórios, ocorre em inúmeras patologias³⁻⁷. Assim, de modo a avaliar a eficiência da formulação desenvolvida, seleccionou-se um modelo animal de doença, tendo como critérios de selecção o perfil de expressão da E-selectina, a simplicidade de execução dos ensaios e a possibilidade de extrapolar a aplicação desta formulação a outras patologias, envolvendo a expressão da E-selectina. Dos modelos disponíveis, seleccionou-se o modelo da Dermatite de Contacto Alérgica, uma vez que, para além das razões apresentadas, se trata de um modelo que já foi previamente estudado para análise da entrega celular de dexametasona encapsulada em lipossomas direccionados para a E-selectina⁸. Neste modelo, que se estabelece através do contacto da pele dos animais com o composto DNBF (1-fluor-2,4-dinitrobenzeno), a expressão da E-selectina verifica-se principalmente no endotélio vascular de vénulas pós-capilares⁹, começando a aumentar 8 horas após a última aplicação desse composto, mas só atingindo o máximo após 24 horas, e desaparecendo completamente ao final de 14 dias. O paralelismo entre a expressão da E-selectina e a infiltração de granulócitos e monócitos que se verifica

neste modelo, sugere que a E-selectina seja um intermediário importante na acumulação local destas células⁹, o que está de acordo com a informação descrita na literatura relativa a patologias envolvendo células endoteliais, segundo a qual a E-selectina é uma das moléculas de adesão que medeia a ligação de neutrófilos, monócitos e células T direccionadas para a pele^{10,11}. Estudos efectuados em células humanas demonstraram que a E-selectina é expressa no endotélio microvascular activado, como consequência da presença de TNF- α ^{12,13}. Estas observações estão igualmente de acordo com o que se encontra descrito no referido modelo de dermatite, no qual só se verifica expressão da E-selectina em condições inflamatórias⁹.

Têm sido várias as experiências efectuadas no sentido de determinar se a encapsulação ou complexação dos rAd por lipossomas catiónicos, ou o acoplamento a polímeros (tais como PEG) à superfície dos vectores virais, é vantajosa no que diz respeito à neutralização mediada por anticorpos preexistentes. Os resultados obtidos na maioria dos trabalhos demonstraram que as abordagens referidas confirmam a hipótese colocada¹⁴⁻¹⁸. Contudo, são poucas as referências existentes na literatura descrevendo o papel da encapsulação, ou do acoplamento do PEG aos rAd, na modulação do desenvolvimento da resposta imunitária adaptativa contra os referidos vectores virais. Nesse sentido, procurou-se também avaliar se a dissimulação dos rAd face ao sistema imunitário, por ocultação dentro de lipossomas, a par do seu redireccionamento para células endoteliais, resulta na diminuição da resposta imunitária adaptativa contra aqueles vectores.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Interação entre proteínas do soro com vectores adenovirais- análise por Western blot

Vectores virais (2×10^{10} de genomas de rAd) foram misturados com uma solução tampão contendo Tris HCl de pH 6,8, SDS (dodecil sulfato de sódio), azul de bromofenol, glicerol e 2-mercapoetanol, e incubados a 95 °C durante 5 minutos, tendo sido de seguida aplicados num gel de acrilamida a 10 %. O gel foi sujeito a electroforese (Mini-Protean 3), após o que as proteínas virais foram transferidas para uma membrana (S83 Optitran BA Whatman) utilizando o sistema Mini Transblot Cell

(Bio Rad), aplicando uma amperagem de 350 mA durante 90 minutos. Subsequentemente, a membrana foi incubada com uma solução de Ponceau red (0,1 g de *Ponceau red* em ácido tricloroacético a 6 %) de modo a visualizar temporariamente as proteínas virais, tendo-se tirado uma cópia para posterior análise. Após remoção do corante, prosseguiu-se a análise por Western blot. Assim, a membrana foi lavada com água e com PBS contendo Tween (Sigma) a 0,2 % (PBST), e seguidamente bloqueada com PBST contendo leite em pó a 5 %, durante 45 minutos. De seguida, a membrana foi seccionada, seguindo a orientação inicial dos poços do gel de acrilamida, de modo a obter 8 tiras, todas contendo as mesmas proteínas virais separadas nas mesmas condições. Adicionalmente, obteve-se outra tira, correspondente aos marcadores de peso molecular das proteínas (6 kDa a 180 kDa) (BenchMark, Invitrogen) e ao controlo positivo da transferência de proteínas, constituída por extracto celular de células HEK-293, o qual contém tubulina. Cada uma das 8 tiras foi incubada individualmente com soro de 8 ratinhos BalbC machos, na diluição de 1/100 em PBST, na presença de leite na concentração de 5 %. A tira correspondente ao controlo de transferência (extracto celular de células HEK-293) foi incubada com um anticorpo de ratinho anti-tubulina, na diluição de 1/10000. O soro utilizado foi obtido de amostras de sangue recolhido após punção, o qual foi subsequentemente incubado à temperatura ambiente para separação do soro. As amostras foram de seguida centrifugadas a 20800 g durante 20 minutos, a 4 °C, após o que o soro foi dividido em alíquotas e utilizado para análise por Western blot (o soro restante foi mantido a -80 °C). Após lavagem das tiras, estas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-ratinho, conjugado com peroxidase (horseradish peroxidase), na diluição de 1/2000 em PBST. Este anticorpo, assim como a película fotográfica e o substrato da peroxidase utilizados na revelação, pertencem ao *kit* Amersham ECL Western Blotting System (Amersham), e foram utilizados de acordo com as recomendações do fornecedor.

6.2.2. Preparação de imunolipossomas contendo rAd

Os imunolipossomas e os respectivos controlo foram preparados, conforme indicado na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 5, diferindo apenas no facto de o anticorpo de ratinho anti-E-selectina humana (H18/7) utilizado como ligando, ter sido substituído por um anticorpo de rato anti-E-selectina de ratinho (Mes-1). A IgG2a de rato MES-1 foi doada pelo Dr. D. Brown (Celltech Group, UK).

6.2.3. Modelo animal de dermatite de contacto alérgica

Ratinhos machos BalbC (Charles River), com 8 semanas de idade foram mantidos em conformidade com normas institucionais e de acordo com a lei nacional italiana (D.L. n. 116, G.U., Suppl 40, February 18, 1992, Circolare no. 8, G.U., July 14, 1994) e internacional (EEC Council Directive 86/609, OJL 358, December 12, 1987). Os animais tinham livre acesso a ração padrão e a água.

O pêlo da área abdominal dos animais foi removido e metade dessa área foi sensibilizada com 25 µl de DNBF (Sigma) a 0,5 %, em acetona e azeite (1:4), tendo-se efectuado nova aplicação após 24 horas. Após 12 dias fez-se nova estimulação com 25 µl de DNBF a 0,2 % em acetona e azeite (1:4). A outra metade da área abdominal corresponde ao controlo da pele quiescente uma vez que não foi activada com o composto DNBF.

6.2.4. Administração dos imunolipossomas

Após a última aplicação do composto DNBF, aguardou-se um período de 24 horas para permitir o máximo da expressão da E-selectina, conforme referido na secção “Introdução”, tendo-se administrado a diferentes animais a formulação de imunolipossomas contendo rAd e os respectivos controlo, compostos por lipossomas não direccionados contendo rAd, rAd livres e HBS. As formulações foram administradas por injeção intravenosa na veia jugular, tendo sido utilizados dois animais por condição para avaliação da resposta imunitária, e 3 animais por condição para o estudo da actividade de transdução.

6.2.5. Influência das proteínas séricas na neutralização dos rAd e extensão do desenvolvimento de anticorpos contra as proteínas virais

Antes da administração dos imunolipossomas e respectivos controlo, assim como 14 dias após a sua administração, recolheu-se uma amostra de sangue dos animais e o respectivo soro foi preparado conforme acima referido. A análise da influência das proteínas séricas na diminuição da actividade dos rAd foi efectuada por incubação de células HUVEC com quantidades fixas do vector Ad₅pCMVGFP. Por sua vez, os referidos vectores virais foram previamente incubados com soro dos diferentes animais (antes da inoculação), durante 1 hora a 37 °C. Após 48 horas, as células foram

analisadas por citometria de fluxo para detecção da eficiência de transdução em cada uma das condições. A diminuição da eficiência de transdução resultante da incubação dos rAd com o soro de animais não inoculados, em relação à condição controlo resultante da incubação de rAd com PBS, reflecte a interacção das proteínas do soro com os rAd.

A análise do desenvolvimento de anticorpos foi efectuada de um modo semelhante, tendo-se comparado neste caso o efeito do soro proveniente de animais injectados com HBS, na inibição da transdução mediada por rAd, com o efeito do soro proveniente de animais injectados com a formulação e respectivos controlo (imunolipossomas contendo rAd, lipossomas não direccionados contendo rAd, rAd livres (não associados a lipossomas) e HBS), na transdução mediada pelos rAd. A diminuição da actividade dos rAd observada nestas circunstâncias foi interpretada como sendo consequência do desenvolvimento de anticorpos, que posteriormente se associam aos respectivos epítomos virais impedindo a ligação dos rAd às células.

6.2.6. Cultura celular

As células HUVEC foram mantidas em cultura de acordo com o protocolo referido na secção de “Materiais e métodos” do Capítulo 3.

6.2.7. Avaliação da transdução *in vivo*

Para avaliação da transdução *in vivo*, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de xilazina e cetamina na dose de 5 mg por kg e 10 mg por kg, respectivamente. A pele da área abdominal foi removida, e separada em tecido activado (tratado com DNBF) e tecido quiescente, correspondente ao flanco em que não se aplicou DNBF. Após remoção do tecido, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

As amostras de tecido foram congeladas na presença de meio de inclusão para tecidos (Tissue-Tek, Sakura Finetek), em isopentano arrefecido em azoto líquido, e armazenadas a -80 °C para futura análise. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em crióstato, tendo-se procedido previamente ao seu corte transversal, seguido da criosecção a partir da região central de cada amostra. Foram vários os protocolos aplicados para efectuar a sua análise. No primeiro procedimento, após fixação do tecido com PFA a 4 %, as lâminas foram lavadas com PBS e preparadas por

adição de meio de montagem Vectashield contendo DAPI, para marcação dos núcleos celulares. O processo de fixação foi realizado por incubação com PFA a 4 %, uma vez que de entre os protocolos de fixação analisados (fixador de zinco para imunohistoquímica da BD Biosciences, acetona a 4 °C durante 10 minutos e PFA durante 15 minutos seguido de neutralização com uma solução de glicina na concentração de 0,1M), o que envolveu o uso de PFA foi o que permitiu uma melhor visualização dos vasos sanguíneos marcados com anticorpo anti-PECAM-1.

No segundo procedimento, após fixação com PFA, as lâminas foram lavadas com PBS e bloqueadas com uma solução de soro de cavalo a 5 % em PBS (solução bloqueadora), durante 45 minutos a 37 °C. Após esse período, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário produzido em rato, contra a glicoproteína PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) de ratinho (550274, Pharmingen) diluído 1/50 em solução bloqueadora, durante 30 minutos a 37 °C. De seguida lavou-se com PBS durante 5 minutos e incubou-se com o anticorpo secundário conjugado com FITC (A21434, Molecular Probes) diluído 1/200 em solução de bloqueio, durante 45 minutos a 37 °C, após o que as amostras foram lavadas com PBS. As lâminas foram limpas e preparadas com meio de montagem contendo DAPI.

No terceiro procedimento, os passos foram em tudo idênticos aos apresentados no procedimento anterior, com a diferença de que se utilizou um anticorpo anti-GFP como anticorpo primário (sc-8334, Santa Cruz), o qual foi produzido em coelho. Como anticorpo secundário, utilizou-se um anticorpo de burro anti-coelho, conjugado com um fluoróforo verde (A21208, Molecular Probes).

No quarto procedimento, procedeu-se a uma dupla imunofluorescência do tecido, em que os anticorpos primários anti-GFP (sc-8334, Santa Cruz) e anti-PECAM-1 (550274, Pharmingen) foram incubados simultaneamente. Como anticorpos secundários, utilizou-se um anticorpo anti-coelho conjugado com um fluoróforo vermelho na diluição de 1/200, e para marcação da molécula PECAM-1 utilizou-se um anticorpo anti-rato conjugado com um fluoróforo verde, na diluição de 1/500, ambos adquiridos da Molecular Probes. Os passos subsequentes foram idênticos aos descritos no segundo procedimento apresentado.

Todas as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência, com exceção das amostras resultantes do quarto procedimento, as quais foram analisadas por microscopia confocal.

6.3. Resultados

6.3.1. Interação entre os rAd e as proteínas do soro de ratinho

O estabelecimento de interações não específicas entre os vectores virais e as proteínas do soro pode contribuir decisivamente para a diminuição da sua actividade biológica.

De modo a determinar a existência de interações entre as proteínas do soro de ratinho e os rAd, utilizou-se um protocolo experimental baseado na técnica de Western blot, no qual as proteínas existentes na membrana de transferência correspondem às proteínas virais, e em que o papel de “anticorpo primário” foi desempenhado pelo soro de ratinho. Após marcação das proteínas séricas com anticorpo secundário anti-ratinho foi possível verificar que a maioria das proteínas do soro dos animais interagem fortemente com as proteínas virais (Figura 6.1). A interação observada é provavelmente resultado de interações não específicas, e não de uma resposta do tipo anticorpo/antigénio, uma vez que os animais se encontravam isolados, e como tal com baixa probabilidade de terem desenvolvido anticorpos contra os vectores virais. Estes resultados revelam uma vantagem potencial da formulação desenvolvida, uma vez que a encapsulação dos rAd em lipossomas poderá prevenir as interações não específicas observadas entre os rAd e as proteínas do soro.

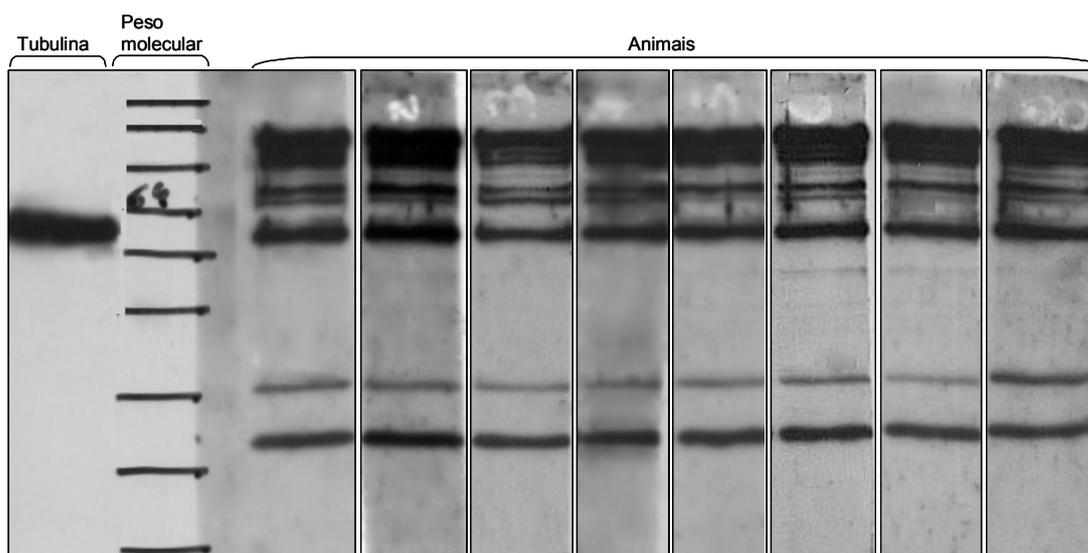


Figura 6.1- Interação entre proteínas do soro com vectores adenovirais

Os vectores virais (2×10^{10} de genomas de rAd) foram aplicados num gel de acrilamida a 10 %. As proteínas virais foram transferidas para uma membrana (S83 Optitran BA Whatman) a qual foi seccionada, de modo a obter 8 tiras, todas contendo as mesmas proteínas virais separadas nas

mesmas condições. Adicionalmente, obteve-se uma outra tira correspondente aos marcadores de peso molecular das proteínas (6 kDa a 180 kDa) e ao controlo positivo da transferência de proteínas (constituída por extracto celular de HEK-293, o qual contém tubulina). Cada uma das 8 tiras foi incubada com o soro de 8 ratinhos (1/100 em PBST) e a tira correspondente à tubulina foi incubada com um anticorpo de ratinho anti-tubulina na diluição de 1/10000. Após lavagem das tiras, estas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-ratinho, conjugado com peroxidase (*horseradish peroxidase*), na diluição de 1/2000 em PBST. A revelação foi efectuada numa película fotográfica na presença de substrato da enzima peroxidase.

Com o objectivo de comprovar a hipótese de que a interacção entre as proteínas virais e as proteínas séricas possa comprometer a actividade biológica dos vectores adenovirais, procedeu-se à incubação de uma quantidade conhecida de rAd com soro de ratinho a 50 %, utilizando como controlo rAd incubados com PBS. Os vectores virais foram seguidamente incubados com células HUVEC e, após 48 horas, a eficiência de expressão do transgene (GFP) foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados ilustrados na Figura 6.2 demonstram claramente que a incubação dos rAd com o soro induz uma diminuição da eficiência de transdução dos vectores virais em 50 % das células endoteliais, um valor significativamente inferior ao observado na ausência de soro (100 % de células transduzidas). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos na experiência anterior, e demonstram claramente que a interacção das proteínas do soro com estes vectores é um factor limitativo da sua eficiência de transdução, facto que reforça as vantagens da sua encapsulação em lipossomas.

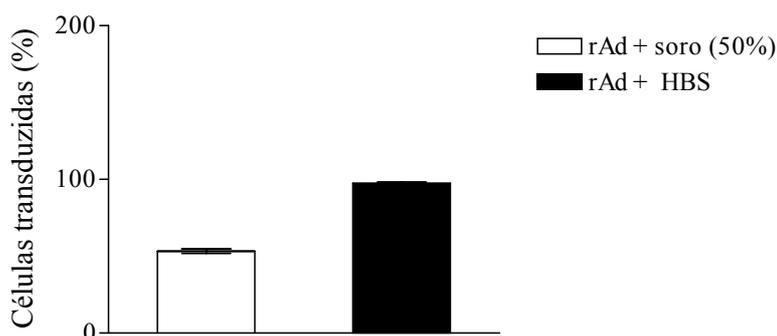


Figura 6.2- Influência das proteínas séricas na neutralização dos rAd

Soro proveniente de vários animais foi recolhido antes da administração dos imunolipossomas e respectivos controlo. A análise da influência das proteínas séricas na diminuição da actividade dos rAd foi efectuada por incubação de quantidades fixas de vectores virais com soro dos diferentes animais, durante 1 hora a 37 °C, seguido da incubação com células HUVEC. O controlo realizou-se de modo semelhante, com substituição do soro por HBS. Após 48 horas, as células foram analisadas por citometria de fluxo para detecção da eficiência de transdução em cada uma das condições. Cada barra respeitante à condição (rAd + soro (50 %)) corresponde à média dos resultados obtidos com o soro de oito animais.

6.3.2. Eficiência de transdução *in vivo* mediada por imunolipossomas contendo rAd

Os imunolipossomas contendo rAd e os respectivos lipossomas controlo (sem anticorpo) foram injectados por via intravenosa, utilizando uma dose de 60 nmol de lípido total por animal, correspondendo aproximadamente a 2×10^8 unidades infecciosas. Após 48 horas, os animais foram sacrificados, tendo sido a pele da zona abdominal adequadamente removida, de modo a permitir a visualização da GFP expressa por microscopia de fluorescência. A mesma amostra foi previamente incubada com anticorpo para a glicoproteína PECAM-1 expressa nas células endoteliais. Deste modo, é possível a visualização simultânea das células transduzidas e do endotélio dos vasos sanguíneos, o que permite analisar a especificidade da entrega do transgene.

Os resultados inicialmente obtidos pareciam sugerir a ocorrência da expressão da GFP no endotélio vascular (Figura 6.3). Contudo, a análise do respectivos controlos, ou seja, da área de pele não sujeita a activação, assim como de amostras de pele de animais injectados com HBS (resultados não apresentados), indicam a existência de um nível basal de fluorescência elevado, impedindo conclusões definitivas sobre a eficiência de transdução. As observações encontram-se adicionalmente dificultadas pelo facto do *background* ser bastante heterogéneo, variando de acordo com o tipo de estrutura e com o tipo de camada da pele. As imagens apresentadas na Figura 6.3 foram previamente tratadas, de maneira a reduzir de igual modo a intensidade do *background* em todas as condições. Após este tratamento, o controlo negativo correspondente a áreas de pele não activadas, continua a apresentar áreas de fluorescência no canal verde (GFP), ainda que nem sempre com correspondência a áreas de fluorescência vermelha (vasos sanguíneos). Em contraste, no tecido sujeito à activação com o composto DNBF, observam-se zonas de fluorescência verde, que se sobrepõem sempre a zonas correspondentes a vasos sanguíneos. No entanto, devido à falta de clareza dos resultados apresentados, testaram-se procedimentos experimentais alternativos para visualização da expressão da GFP, que incluem a análise das amostras sem qualquer marcação prévia para os vasos sanguíneos, a análise por imunofluorescência para detecção da GFP (visando uma ampliação do sinal da proteína transgénica) e análise por imunofluorescência para detecção simultânea da GFP e PECAM-1 usando microscopia confocal.

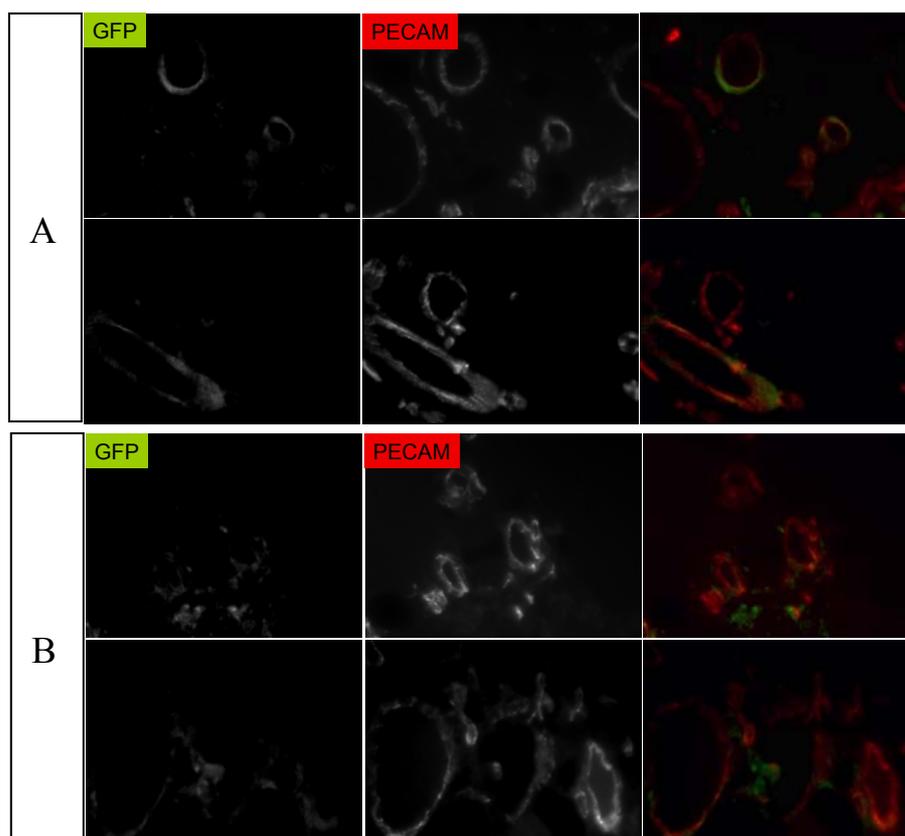


Figura 6.3- Avaliação da transdução *in vivo*

Os animais foram anestesiados e a pele da área abdominal foi removida, e separada em tecido activado (tratado com DNBF) e tecido quiescente, correspondente ao flanco em que não se aplicou DNBF. As amostras de tecido foram congeladas na presença de meio de inclusão para tecidos (Tissue-Tek, Sakura Finetek), em isopentano arrefecido em azoto líquido, e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em crióstato e processadas para análise. Assim, após fixação do tecido com PFA a 4 %, seguido de neutralização com uma solução de glicina, as amostras foram sujeitas a imunofluorescência utilizando uma solução de um anticorpo primário, produzido em rato, contra a glicoproteína PECAM-1 de rato, diluído 1/50 e posteriormente com o anticorpo secundário conjugado com FITC, numa diluição de 1/200. As lâminas foram lavadas e preparadas com meio de montagem contendo DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência, utilizando uma objectiva com ampliação de 40 \times . A avaliação da eficiência de transdução foi efectuada em 3 animais por condição. O primeiro grupo de imagens (A) corresponde a amostras de pele activadas, e o segundo grupo (B) corresponde a amostras de pele quiescentes. A primeira coluna de resultados corresponde às imagens observadas para detecção da GFP, a segunda coluna corresponde às imagens observadas para detecção do endotélio vascular, e a terceira coluna corresponde à sobreposição das imagens obtidas em ambos os canais.

Apesar do esforço efectuado no sentido de analisar as amostras o mais exaustivamente possível, não foi possível tirar conclusões sobre a eficácia e especificidade da formulação desenvolvida, em parte devido ao facto de se tratar de resultados preliminares. No entanto, esta abordagem permitiu o aperfeiçoamento de métodos de detecção de vasos sanguíneos no modelo em causa, os quais podem ser utilizados em experiências posteriores. Face a estes resultados, será necessário em

trabalhos futuros realizar uma análise sistemática dos vários parâmetros que poderão condicionar a eficiência da formulação *in vivo*, à semelhança do efectuado nos estudos realizados com células em cultura (Capítulo 5). A título de exemplo, parece-nos importante demonstrar a sobre-expressão da E-selectina nos vasos sanguíneos existentes nas áreas tratadas com DNBF e, posteriormente, proceder a uma análise comparativa da extensão da associação de imunolipossomas direccionados para os vasos sanguíneos dos tecidos activados e não activados. Os resultados deste tipo de experiências serão cruciais para a optimização das condições experimentais a utilizar na avaliação da eficiência dos imunolipossomas desenvolvidos, no modelo referido.

6.3.3. Resposta do sistema imunitário aos rAd encapsulados em imunolipossomas

Tal como referido no Capítulo 5, uma das vantagens teoricamente associadas à encapsulação de rAd em lipossomas direccionados, consiste em atenuar a interacção dos rAd com os anticorpos preexistentes e/ou na diminuição da resposta imunitária adaptativa contra as proteínas destes vírus, em indivíduos não imunizados. O segundo pressuposto baseia-se no facto deste procedimento permitir, pelo menos em teoria, diminuir o acesso dos epítomos virais aos linfócitos B, diminuindo também o reconhecimento e o processamento dos rAd pelas células apresentadoras de antígenos. Assim, neste trabalho procedeu-se à análise do desenvolvimento de anticorpos contra os rAd após administração dos imunolipossomas contendo estes vírus.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6.4, quando os rAd são incubados com soro de animais previamente injectados com adenovírus recombinantes livres, a eficiência de transdução daqueles em células HUVEC é de 37 %, valor significativamente inferior ao obtido após incubação dos rAd com soro de animais injectados com HBS (eficiência de transdução de 50 %). Deste modo, é lógico concluir que no primeiro caso ocorreu produção de anticorpos contra os rAd, os quais, por reconhecerem as proteínas virais da cápside, se associam a estes, diminuindo a sua eficiência de transdução *in vitro*. Ao contrário do esperado, os rAd encapsulados em lipossomas induziram o aparecimento de uma resposta imunitária adaptativa superior à desencadeada pelos rAd livres. Assim, quando a eficiência de transdução foi testada com soro de animais previamente injectados com rAd encapsulados em lipossomas não direccionados, os valores obtidos foram significativamente inferiores (4 %), reflectindo

uma marcada resposta imunitária. Surpreendentemente, os valores de transdução obtidos após incubação com soro recolhido de animais injectados com imunolipossomas contendo os rAd, são mais elevados do que os referidos na condição anterior (soro de animais injectados com lipossomas não direccionados contendo rAd) (20 %), o que reflecte a indução de uma resposta adaptativa inferior à observada pelos lipossomas não direccionados (Figura 6.4).

Estes resultados revelam que o efeito imuno-adjuvante das formulações supera a sua capacidade de mascarar os vectores virais face aos linfócitos B.

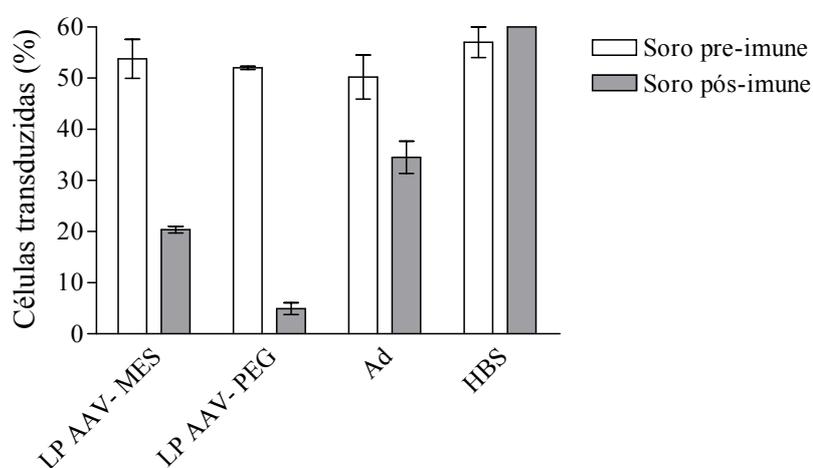


Figura 6.4- Extensão do desenvolvimento da resposta imunitária contra as proteínas virais

O soro proveniente de vários animais foi recolhido 14 dias após administração dos imunolipossomas e respectivos controlo. Os resultados da influência do soro de animais inoculados com HBS, na transdução mediada por rAd, foram comparados com os observados para o soro proveniente de animais injectados com a formulação e respectivos controlo (imunolipossomas contendo rAd- LP AAV-MES, lipossomas não direccionados contendo rAd- LP AAV-PEG, rAd livres (Ad)). Procedeu-se à incubação de quantidades fixas de rAd com o soro de animais, durante 1 hora a 37 °C, seguindo-se a incubação com células HUVEC.

Devido à escassez de trabalhos realizados nesta área, torna-se difícil encontrar dados na literatura que possam suportar possíveis explicações para os resultados obtidos. De qualquer modo, os resultados apresentados na Figura 6.4 sugerem a ocorrência de exposição directa de proteínas virais aos linfócitos B, após administração intravenosa dos lipossomas, só assim se podendo explicar a produção de anticorpos contra os rAd. Assim, e apesar dos resultados obtidos no Capítulo 5, segundo os quais os lipossomas seriam bastante estáveis na presença de soro não desactivado, os dados obtidos nestas experiências podem sugerir que, quer os imunolipossomas, quer os lipossomas não direccionados, poderão sofrer um certo grau de desestabilização *in vivo*,

provavelmente consequência da lise induzida por proteínas do complemento. Alguns rAd poderão encontrar-se livres após este fenómeno, ou de algum modo encontrar-se ainda associados aos imunolipossomas. Paralelamente, é de esperar ainda a acção directa de células fagocíticas na eliminação dos lipossomas, de entre as quais, algumas apresentando a função adicional de células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas). Pensa-se que é através destas células apresentadoras de antígenos (APC), as quais irão activar as células T, que a presença de lipossomas e/ou moléculas de PEG poderão exercer um efeito imunoestimulatório, aumentando drasticamente a resposta dos linfócitos T *helper* (CD4⁺). Consequentemente, da interacção das proteínas virais expostas com os respectivos clones de linfócitos B, possuidores de receptores BCR (*B cell receptors*) específicos para determinadas proteínas virais, e da interacção desses mesmos clones de linfócitos B com as células T *helper* fortemente activadas, resulta um aumento drástico da produção de anticorpos contra os vectores virais. Neste contexto, importa referir trabalhos indicativos de que antígenos encapsulados em determinado tipo de lipossomas podem desencadear uma maior produção de anticorpos do que antígenos administrados isoladamente^{19,20}, o que está de acordo com os resultados obtidos.

São várias as hipóteses, não mutuamente exclusivas, que podem justificar as diferenças entre os efeitos observados utilizando soro de animais tratados com imunolipossomas e lipossomas não direccionados: (i) uma maior estabilidade dos imunolipossomas quando comparada com os lipossomas não direccionados, e como tal menor propensão para a desestabilização mediada pelas proteínas séricas (por exemplo, proteínas do complemento); (ii) possibilidade de que a presença do anticorpo Mes-1 na extremidade distal da molécula de PEG possa mascarar o efeito imunoestimulatório deste polímero, por exemplo por diminuição da sua interacção com células apresentadoras de antígenos (APC); (iii) *clearance* sanguínea mais rápida dos imunolipossomas como consequência da sua interacção com células do sistema fagocítico, favorecida pelo anticorpo Mes-1 à superfície dos lipossomas (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), com consequente diminuição da exposição do seu conteúdo, ou seja dos rAd, aos linfócitos B. Neste sentido, resultados obtidos por Koning e colaboradores²¹ indicam que a presença de anticorpo acoplado aos lipossomas permite a interacção destes com macrófagos extraídos do fígado de rato, interacção essa que é tanto maior quanto maior a densidade de anticorpos à superfície dos lipossomas; (iv) pode ainda considerar-se que o anticorpo Mes-1 possa interagir com os respectivos

receptores BCR dos linfócitos B, diminuindo deste modo a interação entre os rAd, que possam estar expostos, e os respectivos clones de linfócitos B; (v) possibilidade de que a associação dos imunolipossomas, expondo regiões Fc (região constante) do anticorpo Mes-1, a células B (associação mediada pelas proteínas virais) resulte na destruição daquele clone celular mediada pelas células NK (*natural killer*)²², daí resultando uma diminuição da capacidade de produção de anticorpos contra os rAd.

É contudo necessário realçar que os resultados obtidos não inviabilizam o primeiro dos pressupostos considerados, segundo o qual os imunolipossomas protegem os rAd da neutralização mediada por anticorpos preexistentes contra os referidos vectores, e que este efeito se reveste de grande importância uma vez que permite manter expressão do transgene mesmo na presença de anticorpos contra o vector viral.

Ainda no âmbito da resposta imunitária, os estudos realizados inicialmente sobre o efeito das moléculas de PEG indicaram que estas conferem elevados tempos de circulação aos lipossomas, consequência da diminuição da acumulação destes no fígado e no baço²³, e reduzem a sua interação com proteínas do complemento²⁴. Contudo, estudos posteriores demonstraram que quando se procede a uma segunda administração, se verifica uma diminuição brusca do tempo de meia-vida dos lipossomas associados a PEG, como consequência do desenvolvimento de anticorpos contra as moléculas de PEG²⁵. Por outro lado, foi já possível identificar alguns factores que permitem modular a farmacocinética após uma segunda administração, entre eles, a primeira dose administrada. Ishida e colaboradores²⁶ reportaram que quando a primeira dose de lipossomas/PEG administrada é elevada, a eliminação após segunda administração é menos acentuada. Um outro parâmetro importante é a densidade de PEG à superfície dos lipossomas, uma vez que, conforme demonstrado pelos mesmos autores, para densidades superiores a 5 %, se verifica uma diminuição na velocidade de eliminação dos lipossomas numa segunda administração. Para além dos factores referidos, a extensão e a natureza da resposta imunitária parecem depender também do tipo de estratégia de acoplamento escolhida para promover a ligação química das moléculas de PEG. Mais especificamente, os resultados obtidos por Le e colaboradores²⁷, que incluíram a modificação de proteínas de superfície de rAAV com PEG, demonstraram que o tipo de molécula utilizada para activar a molécula de PEG pode influenciar a intensidade da resposta imunitária desencadeada contra os rAAV. Deste modo, no desenvolvimento e optimização deste tipo de estratégias, parece fundamental correlacionar os vários procedimentos experimentais de acoplamento disponíveis^{28,29}

com o seu contributo para a imunogenicidade do sistema de transporte e/ou dos agentes bioactivos nele contidos.

Para além do exposto, é necessário ainda considerar o papel do polímero PEG na indução de uma resposta imunitária contra ligandos acoplados à superfície lipossómica. Os resultados obtidos por Philips e Dahman³⁰ demonstram que apesar da injeção de um determinado anticorpo só por si não induzir resposta imunitária, o acoplamento deste aos lipossomas aumenta a resposta imunitária contra o anticorpo, e que a inclusão de moléculas de PEG potencia ainda mais essa resposta imunitária. Pode especular-se que essa potenciação descrita para o ligando se verifique também para as proteínas dos rAd encapsulados nos lipossomas, hipótese esta que encontra suporte no facto do papel imuno-adjuvante dos lipossomas ocorrer não só para proteínas associadas à superfície destes, como também para proteínas encapsuladas^{19,20}.

Apesar de preliminares, estes resultados constituem um contributo para a discussão em torno dos mecanismos envolvidos na resposta imunitária desencadeada pelos sistemas lipossómicos, os quais só recentemente começaram a despertar o interesse da comunidade científica. Adicionalmente, os resultados obtidos constituem o ponto de partida para trabalhos futuros a realizar na área dos nanosistemas direccionados encapsulando vectores virais.

6.4. Bibliografia

- 1 Merdan T, Kopecek J, Kissel Tj. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 715-758.
- 2 Uster PS *et al.* Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett* 1996; **386**: 243-246.
- 3 Carmeliet Pj. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**: 653-660.
- 4 Bhaskar V *et al.* E-selectin up-regulation allows for targeted drug delivery in prostate cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 6387-6394.
- 5 Middleton J *et al.* Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: 60-72.
- 6 Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; **66**: 232-245.
- 7 Zund G *et al.* Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 7075-7080.
- 8 Everts M *et al.* In vitro cellular handling and in vivo targeting of E-selectin-directed immunoconjugates and immunoliposomes used for drug delivery to inflamed endothelium. *Pharm Res* 2003; **20**: 64-72.

- 9 Henseleit U *et al.* E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice. *J Pathol* 1996; **180**: 317-325.
- 10 Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; **76**: 301-314.
- 11 Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; **243**: 1160-1165.
- 12 Cotran RS *et al.* Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* 1986; **164**: 661-666.
- 13 Messadi DV *et al.* Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 1987; **139**: 1557-1562.
- 14 Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Cationic liposomes conjugation to recombinant adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment reduces viral antigenicity and maintains antitumor activity in mouse experimental glioma models. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 825-829.
- 15 Steel JC *et al.* Modification of liposomal concentration in liposome/adenoviral complexes allows significant protection of adenoviral vectors from neutralising antibody, in vitro. *J Virol Methods* 2005; **126**: 31-36.
- 16 Yotnda P *et al.* Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses. *Mol Ther* 2002; **5**: 233-241.
- 17 Steel JC *et al.* Increased tumor localization and reduced immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DDAB/DOPE. *Eur J Pharm Sci* 2007; **30**: 398-405.
- 18 Steel JC, Cavanagh HM, Burton MA, Kalle WH. Microsphere-liposome complexes protect adenoviral vectors from neutralising antibody without losses in transfection efficiency, in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2004; **56**: 1371-1378.
- 19 Fries LF *et al.* Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 358-362.
- 20 Shek PN, Sabiston BH. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. II. Comparison of the effectiveness of vesicle-entrapped and surface-associated antigen in immunopotential. *Immunology* 1982; **47**: 627-632.
- 21 Koning GA, Kamps JA, Scherphof GLj. Interference of macrophages with immunotargeting of liposomes. *J Liposome Res* 2002; **12**: 107-119.
- 22 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 118-129.
- 23 Papahadjopoulos D *et al.* Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 11460-11464.
- 24 Bradley AJ *et al.* Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids. *Arch Biochem Biophys* 1998; **357**: 185-194.
- 25 Ishida T *et al.* Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 2006; **112**: 15-25.
- 26 Ishida T *et al.* Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *J Control Release* 2005; **105**: 305-317.

- 27 Le HT, Yu QC, Wilson JM, Croyle MA. Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *J Control Release* 2005; **108**: 161-177.
- 28 Allen TM *et al.* A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1237**: 99-108.
- 29 Hansen CB *et al.* Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1239**: 133-144.
- 30 Phillips NC, Dahman Jj. Immunogenicity of immunoliposomes: reactivity against species-specific IgG and liposomal phospholipids. *Immunol Lett* 1995; **45**: 149-152.

CAPÍTULO 7

Conclusões e perspectivas futuras

Neste capítulo encontram-se sistematizadas as principais conclusões dos estudos apresentados neste trabalho. São também tecidas algumas considerações acerca de aspectos a serem explorados em trabalhos futuros.

Os estudos apresentados e discutidos no **Capítulo 2** desta dissertação permitiram concluir que a razão molar amina/fosfato (N/P) utilizada na preparação de poliplexos de polietilenimina/ADN (PEI/ADN), assim como a concentração do ADN e a força iónica da solução utilizada, condicionam o tamanho final dos referidos complexos.

Os resultados obtidos neste capítulo permitiram também concluir que o PEI ramificado de baixo peso molecular (2,7 kDa) apresenta a capacidade de proteger eficientemente o ADN, impedindo o acesso do brometo de etídio ao ácido nucleico, exibindo também capacidade tampão, quer na forma livre, quer complexado com o ADN. Provavelmente, estas características justificam os elevados níveis de transfecção que foram observados em células HEK-293, principalmente para razões elevadas de amina/fosfato (N/P = 38).

Dos diversos métodos testados para quantificação do ADN após a sua complexação com PEI, e posterior associação a lipossomas, o procedimento envolvendo o tratamento dos lipopoliplexos com ácido polimetacrílico (PMAA) e o reagente PicoGreen demonstrou ser o mais sensível, apresentando adicionalmente vantagens relativamente à segurança da sua aplicação, comparativamente à utilização de ADN marcado com radioisótopos.

No que respeita à preparação de lipopoliplexos (LPPX), pode concluir-se que a eficiência de recuperação do ADN nestes sistemas é favorecida quando estes são preparados através do método da evaporação de fase reversa, seguido de congelamento/descongelamento (REV/FT). Esta constatação é válida quer para LPPX preparados com lípidos neutros (EPC/DOPE/CHOL), quer para LPPX preparados com lípidos de carga negativa e neutra (PI/EPC/DOPE/CHOL), na concentração de 18 mM. Adicionalmente, observou-se que no conjunto dos métodos de preparação analisados, a eficiência de recuperação do ADN mais elevada foi obtida para LPPX apresentando na sua composição o lípido de carga negativa PI.

Experiências adicionais sugerem que os procedimentos utilizados para preparação de LPPX, designadamente os métodos de evaporação de fase reversa e de congelamento/descongelamento, não afectam a integridade nem a actividade do plasmídeo.

A técnica de cromatografia de exclusão molecular, utilizando a resina Sefarose CL-4B, demonstrou ser uma boa estratégia para purificação de LPPX, relativamente à transferrina não acoplada.

Adicionalmente, os resultados obtidos permitem concluir que a quantidade de polímero PEI utilizada, traduzida na razão PEI/ADN, assim como a quantidade e o tipo de PEG reactivo, condicionam a eficiência de acoplamento da transferrina aos LPPX.

A purificação de LPPX relativamente ao NHS-PEG-Mal não acoplado é eficientemente conseguida utilizando a técnica de cromatografia de exclusão molecular. Os LPPX resultantes apresentam um tamanho de aproximadamente 200 nm.

Os estudos de associação celular foram efectuados em células HEK-293, as quais, conforme demonstrado, apresentam receptores de transferrina à sua superfície. Os resultados de microscopia de fluorescência permitiram concluir que lipossomas vazios direccionados para o receptor da transferrina apresentam uma capacidade de interacção com as células HEK-293 aumentada, relativamente a lipossomas não direccionados, comprovando o funcionamento do sistema de direccionamento. Estudos de inibição competitiva permitiram concluir que, nas condições testadas, a extensão da interacção entre os lipossomas direccionados e as células, é parcialmente dependente da transferrina existente à superfície destes, tal como avaliado por citometria de fluxo. Pelo contrário, a utilização de transferrina livre não parece surtir qualquer efeito na extensão da associação celular de lipossomas não direccionados.

Apesar dos resultados promissores observados, nomeadamente o efeito de direccionamento activo na promoção da associação celular, os LPPX direccionados revelaram-se ineficientes a mediar a transfecção de células HEK-293. Face a estes resultados, optou-se por alterar o processo de preparação dos nanotransportadores, tendo os estudos prosseguido com LPPX preparados por hidratação e congelamento/descongelamento, utilizando ADN na concentração de 50 µg/mL e lípido total na concentração de 9 mM. Os estudos de associação celular efectuados com os LPPX resultantes demonstraram que estes interagem com as células de um modo não específico, ou seja, de um modo independente da presença da transferrina, possivelmente devido à existência de polímero PEI adsorvido à superfície dos LPPX.

A confirmar esta possibilidade, está o facto de o tratamento dos LPPX com PMAA, após o passo de extrusão, permitir a obtenção de LPPX que interagem com as células alvo de uma forma dependente da transferrina, à semelhança do observado com os lipossomas vazios.

Apesar dos passos adicionais de optimização, a formulação manteve-se ineficiente do ponto de vista da actividade de transfecção.

Face ao conjunto de conhecimentos adquiridos, e tal como descrito no **Capítulo 3**, optou-se por testar a aplicabilidade da formulação desenvolvida em sistemas endoteliais, utilizando como ligando um anticorpo desenvolvido contra a E-selectina humana (H18/7), molécula expressa pelas células endoteliais activadas.

A incubação das células endoteliais humanas HUVEC com TNF- α induziu a expressão da glicoproteína E-selectina, por oposição ao observado em células quiescentes. As células HUVEC também expressam receptores de transferrina à sua superfície, mas numa percentagem inferior à detectada em células HEK-293. Contudo, e ao invés do que sucede com a E-selectina, esta expressão é independente da activação das HUVEC com mediadores inflamatórios.

Os estudos de interacção entre imunolipossomas vazios e células HUVEC permitiram determinar a quantidade de nanotransportador adequada a incubar com as células. Adicionalmente, outros resultados obtidos por citometria de fluxo permitiram concluir que o tamanho dos imunolipossomas (100, 200 e 400 nm) não influencia os níveis de associação celular, verificando-se que o direccionamento para células activadas foi bem sucedido em todos os casos.

Estudos semelhantes, efectuados com imunolipossomas associados a poliplexos, demonstraram que os níveis de associação celular resultantes da incubação de imunolipossomas encapsulando poliplexos com células HUVEC activadas, são semelhantes aos obtidos com imunolipossomas vazios, indicando a ausência de interacções não específicas, o que permite considerar a ausência de poliplexos adsorvidos à superfície dos imunolipossomas.

Surpreendentemente, apesar dos valores elevados de eficiência de encapsulação e de associação dos nanotransportadores às células, não se observaram níveis de transfecção mensuráveis, nem mesmo após utilização de métodos de preparação alternativos.

Os resultados obtidos aquando da utilização de formulações catiónicas controlaram constituíram a primeira indicação de que, possivelmente, as células endoteliais não sejam permissivas à transfecção mediada por plasmídeos de ADN.

No seu conjunto, os resultados apresentados deixam em aberto a possibilidade de a ineficiência de transfecção observada pelos imunolipossomas contendo poliplexos ser consequência da ineficiente entrega de ADN às células, ou da falta de permissividade

das células HUVEC à transfecção envolvendo ADN plasmídico, devido a limitações pós-intervalização.

No sentido de explorar as vantagens apresentadas pelos nanotransportadores desenvolvidos, nomeadamente a sua selectividade para células endoteliais activadas, optou-se por encapsular vectores virais adeno-associados nos referidos nanotransportadores. Os resultados obtidos foram descritos no **Capítulo 4**, e permitiram concluir que a utilização do gradiente de Ficoll é um processo eficiente na purificação de transportadores associados a rAAV, resultando em lipossomas que apresentam uma eficiência de encapsulação entre 1 a 1,5 %.

Os resultados obtidos comprovam que o acoplamento de ligandos, como a transferrina ou o H18/7, a lipossomas contendo rAAV permite aumentar a sua extensão de associação às respectivas células alvo (HEK-293 e HUVEC, respectivamente), de um modo semelhante ao apresentado pelos respectivos lipossomas vazios. Estes resultados demonstram que o processo de encapsulação utilizando rAAV não interfere com o perfil de associação celular dos lipossomas, sugerindo a ausência de rAAV adsorvidos à superfície destes.

Apesar dos resultados promissores de associação celular, a formulação não demonstrou eficiência de transdução em nenhuma das situações testadas, sendo que estudos adicionais evidenciaram que estes vectores não são sensíveis à temperatura de trabalho, após descongelamento. Esta observação sugere que a ineficiência da formulação não está associada à perda de actividade biológica dos rAAV ao longo do tempo e, como tal, não aparenta ser consequência do processo de preparação.

Experiências realizadas com as células HUVEC demonstraram que estas não são permissivas à transdução por rAAV dos tipos 1, 2, 6 ou 8, permitindo especular, uma vez mais, sobre as limitações de entrada dos vectores nas células, e sobre o seu processamento após internalização celular.

No sentido de esclarecer os motivos inerentes à falta de transdução por rAAV, efectuou-se um conjunto de experiências com complexos resultantes da mistura de lipossomas pré-formados (catiónicos e aniónicos) com os vectores virais. No geral, os resultados obtidos demonstraram que a variação da carga e da composição lipídica associadas aos complexos não promoveu a transdução em nenhum dos tipos celulares (células HEK-293 e HUVEC). Com base nestes resultados, não é possível concluir se a ausência de transdução observada com os rAAV livres em células HUVEC é ou não

consequência de limitações de internalização celular. Do mesmo modo, não é possível concluir se a ineficiência de transdução observada aquando da incubação de lipossomas direccionados, com as respectivas células alvo, terá sido consequência da entrega de um número insuficiente de vectores virais a estas células. Paralelamente, mantém-se em aberto a hipótese de que, em todas as aproximações testadas envolvendo rAAV associados a lipossomas, estes sejam internalizados por vias intracelulares que impeçam a sua transdução, por exemplo, por dificultarem o transporte para o núcleo, ou por condicionarem a libertação do genoma viral da cápside.

Estudos adicionais envolvendo estratégias conhecidas por promoverem a transdução de células mediada por rAAV (incubação com hidroxureia) também se revelaram inconclusivos acerca das limitações à transdução mediada por estes vectores, em células HUVEC.

No **Capítulo 5** procedeu-se à descrição dos resultados obtidos aquando da substituição dos rAAV por vectores adenovirais (rAd).

A remoção de vectores adenovirais não encapsulados foi eficientemente conseguida utilizando um gradiente de cloreto de cézio, sendo que a presença de elevadas concentrações deste composto na solução de trabalho não interfere com a eficiência do acoplamento da molécula de NHS-PEG-Mal aos lipossomas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a temperatura de trabalho, após descongelação dos rAd, constitui um parâmetro crítico, uma vez que condiciona a actividade dos adenovírus dos tipos 2 e 5. Com base neste conhecimento, foi realizado um trabalho de optimização do processo de preparação dos nanotransportadores, o qual se traduziu numa redução significativa do tempo e da temperatura de preparação de imunolipossomas, minimizando assim o impacto na actividade dos rAd.

Apesar de imunolipossomas com diâmetro de 400 nm apresentarem uma eficiência de associação às células similar à das partículas de 200 nm, conforme observado por citometria de fluxo, os resultados de microscopia confocal permitiram concluir que, no primeiro caso, os lipossomas se encontram acumulados principalmente na membrana celular, sem que ocorra internalização significativa. Como tal, os lipossomas extrudidos por membranas com poros de diâmetro de 200 nm foram os seleccionados para prosseguir os estudos.

O padrão de associação celular de imunolipossomas contendo vectores adenovirais é semelhante ao padrão observado com imunolipossomas vazios, sugerindo a inexistência de vectores adsorvidos à superfície dos lipossomas.

A análise de células incubadas com imunolipossomas por microscopia confocal, permitiu concluir que estes são internalizados pelas células, indicando que esta estratégia é promissora para a entrega intracelular de transgenes a células endoteliais activadas.

Apesar dos baixos valores observados para a eficiência de encapsulação dos vectores adenovirais (característicos do processo de encapsulação passiva), o elevado título das preparações de adenovírus permitiu a encapsulação de um número de vectores virais suficiente, para conferir capacidade de transdução aos imunolipossomas. Assim, a encapsulação de rAd em imunolipossomas possibilitou elaborar uma curva dose/resposta referente à expressão do transgene.

A especificidade da transdução observada na presença de soro bovino não desactivado é indicativa da estabilidade da formulação em condições próximas das fisiológicas.

Relativamente aos estudos de viabilidade celular, estes demonstraram que a formulação, uma vez internalizada, induz alguma toxicidade, provavelmente resultante dos vírus recombinantes utilizados, cujas preparações se encontram frequentemente contaminadas por vírus com capacidade de replicação, e conseqüentemente com capacidade para induzir lise celular.

A ausência de internalização celular, observada a 4 °C, indica que este processo é dependente de energia, sugerindo o envolvimento da via endocítica. Os estudos de inibição competitiva resultaram numa redução significativa da transdução celular, indicando claramente que este processo é dependente da internalização dos imunolipossomas, especificamente mediada pela E-selectina expressa à superfície das células activadas.

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que se efectuou encapsulação de vectores adenovirais em lipossomas, com subsequente acoplamento de um ligando com o objectivo de conferir direccionamento.

De um modo geral, pode concluir-se que a formulação desenvolvida demonstrou ser eficiente no reconhecimento e entrega de adenovírus recombinantes a células endoteliais activadas, com conseqüente expressão do transgene transportado, apresentando características adequadas para administração intravenosa. Estes factos

traduzem-se no elevado potencial dos imunolipossomas encapsulando rAd para aplicação em terapia génica, nomeadamente em patologias que envolvam células endoteliais.

No **Capítulo 6** encontram-se descritos resultados relativos aos estudos preliminares desenvolvidos *in vivo*. Nesse âmbito, e apesar das expectativas criadas com os resultados obtidos *in vitro*, não foi possível tirar conclusões definitivas sobre a eficácia e a especificidade da formulação *in vivo*.

Experiências adicionais permitiram concluir que a maioria das proteínas do soro dos animais interage fortemente com as proteínas dos vectores virais livres, constituindo um factor limitativo da sua eficiência de transdução, facto que reforça as vantagens da encapsulação dos rAd em lipossomas.

No que respeita aos estudos efectuados no âmbito da dissimulação de rAd face aos linfócitos B, verificou-se que os rAd encapsulados em lipossomas induziram o aparecimento de uma resposta imunitária adaptativa superior à desencadeada pelos rAd livres, sendo que essa diferença é menor quando se utilizam imunolipossomas.

Apesar de preliminares, estes resultados constituem um contributo para a discussão em torno dos mecanismos envolvidos na resposta imunitária desencadeada pelos sistemas lipossómicos, os quais só recentemente começaram a despertar o interesse da comunidade científica. O trabalho desenvolvido suscita novas questões que constituem o ponto de partida para trabalhos futuros em torno da utilização *in vivo* de nanosistemas direccionados encapsulando vectores virais.

Perspectivas futuras

Na perspectiva da aplicação destas formulações em ensaios clínicos, vários são os aspectos que deverão ser considerados, de entre os quais se salienta a optimização do vector adenoviral, a optimização do nanotransportador e a optimização dos genes terapêuticos e promotores utilizados.

No que respeita à optimização dos vectores adenovirais, será importante minimizar a apresentação de proteínas virais à superfície das células transduzidas, de modo a evitar a sua posterior identificação e destruição pelo sistema imunitário. Esta característica poderá ser conseguida através da re-introdução do gene E3 no genoma do vector viral, uma vez que as proteínas codificadas por este gene são responsáveis por minimizar a

apresentação de antígenos virais à superfície das células infectadas aumentando, deste modo, a viabilidade das referidas células. Neste contexto, também se pode considerar a eliminação total das sequências virais no vector (com excepção de LTR), sendo que neste caso será necessário resolver problemas relacionados com os títulos de produção dos vectores resultantes.

Para além das optimizações a efectuar no vector viral, o próprio nanotransportador poderá ser aperfeiçoado através da realização de algumas alterações, conforme sugerido pelos resultados obtidos no Capítulo 6. Neste contexto, o ligando utilizado, terá na prática clínica de ser substituído por um ligando menos imunogénico, como por exemplo por fragmentos de anticorpos ou anticorpos humanizados. Neste âmbito, e à luz de algumas informações mais recentes, o tipo de ligações covalentes utilizadas no processo de acoplamento do ligando ao espaçador PEG deve ser avaliada, e se necessário alterada, de modo a que no seu conjunto o vector viral e nanotransportador apresentem baixa imunogenicidade, ou seja, neutralidade face às respostas imunitária inata e adaptativa.

Apesar dos esforços efectuados no sentido de aumentar a interacção das formulações com as células alvo, é utópico considerar a evasão total aos órgãos de eliminação, pelo que a identificação e incorporação de promotores fortes e específicos nos vectores virais permitirá evitar a transdução em órgãos responsáveis pela sua eliminação, conferindo, como tal, segurança adicional a estes sistemas.

Paralelamente à área do desenvolvimento dos nanotransportadores, há ainda a considerar um outro factor importante que assenta no aprofundamento dos conhecimentos relativos às bases moleculares essenciais para que a terapia génica tenha sucesso. A título de exemplo, na promoção da angiogénese parece fundamental a identificação de sequências correctas de expressão dos diversos factores de crescimento, assim como o tempo e a concentração necessários para que se formem vasos sanguíneos funcionais.

Numa perspectiva mais alargada, a versatilidade exibida pelo sistema nanotransportador desenvolvido neste trabalho permite considerar a sua utilização para transporte e cedência intracelular de outras moléculas terapêuticas, tais como siARNs e fármacos convencionais, a células endoteliais activadas. Pode também considerar-se a utilização da plataforma tecnológica desenvolvida para o transporte de vectores virais dirigidos a outras populações celulares, seleccionando para tal um ligando adequado, com base na especificidade de marcadores da membrana plasmática.

ABREVIATURAS

AS-ODN	Oligodesoxinucleótidos <i>antisense</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ang-1	Angiopoetina-1
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
BRCA	Gene supressor tumoral (<i>breast cancer</i>)
BrEt	Brometo de etídio
BSA	Albumina sérica de bovino <i>Bovine serum albumin</i>
CAR	Receptor de coxsackievírus e de adenovírus <i>Coxsackievirus adenovirus receptor</i>
CHEMS	Hemissuccinato de colesterolo <i>Cholesteryl hemisuccinate</i>
CHO	Linha celular de ovário de hamster chinês <i>Chinese hamster ovary</i>
CHOL	Colesterol <i>Cholesterol</i>
C₁₂E₈	Mono- <i>n</i> -dodecil-éter-octaetilenoglicol <i>Octaethylene glycol monododecyl ether</i>
CpG	Dinucleótidos citosina-guanina
Cpm	Contagens por minuto
Cy3	Sonda da família da cianina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina <i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina <i>Deoxycytidine triphosphate</i>

dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina <i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNBF	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno <i>Dinitrofluorobenzene</i>
DSPE-PEG	1,2-Diestearoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000
DSPE-PEG-Mal	Grupo maleimida conjugado a uma molécula de 1,2-diestearoilfosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) <i>5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina <i>Deoxythymidine triphosphate</i>
DOGS	Dioctadecilamidoglicoespermina <i>Dioctadecylamidoglycyl spermine</i>
DOPE	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamina 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamine
DOSPA	Trifluoroacetato de 2,3-dioleioil- <i>N</i> -[2(esperminacarboxamido)-etil]- <i>N,N</i> -dimetil-1-propanamina <i>2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)-ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoro acetate</i>
DOTAP	1,2- dioleoil-3 propanoato de trimetilamónio 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DOTMA	Cloreto de <i>N</i> -(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)- <i>N,N,N</i> -trimetilamónio <i>N-(1-(2,3-dioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr <i>Epstein-Barr virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ECGF	Factor de crescimento endotelial de bovino <i>Endothelial cell growth factor</i>
EGF	Factor de crescimento de epiderme <i>Epidermal growth factor</i>
EPC	Fosfatidilcolina de ovo <i>Egg phosphatidylcholine</i>

EPOPC	1-palmitoil-2-oleoilglicero-3-etil-fosfocolina <i>1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Ethylphosphocholine</i>
FBS	Soro fetal de bovino <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	Factor de crescimento de fibroblastos <i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Fluor-PE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carboxifluoresceína)
FT	Método de congelamento/descongelamento <i>Freeze-thawing</i>
GAG	Glicosaminoglicano
GFP	Proteína verde fluorescente <i>Green fluorescent protein</i>
GSH	Glutationa reduzida
HBS	Tampão de HEPES salino <i>HEPES buffer saline</i>
H18/7	Anticorpo de ratinho anti-E-selectina humana
HEK-293	Linha celular derivada de células embrionárias de rim humano <i>Human Embryonic Kidney cells</i>
HeLa	Linha celular de tumor cervical <i>Henrietta Lacks</i>
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil)-piperazina- <i>N'</i> -(2-etanossulfônico) <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)-piperazine- <i>N'</i> -(2-ethanesulfonic acid)
HIF-1	Factor indutível por hipoxia-1 <i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HMW-PEI	Polietilenimina de elevado peso molecular <i>High molecular weight polyethylenimine</i>
HSV	Vírus <i>Herpes simplex</i> <i>Herpes simplex vírus</i>
HU	Hidroxiureia
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>

IκB	Inibidores do NF-κB
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
ITR	Repetições terminais invertidas <i>Inverted terminal repeats</i>
LMW-PEI	Polietilenimina de baixo peso molecular <i>Low molecular weight polyethylenimine</i>
LP AAV-H18/7	Lipossomas contendo rAAV conjugados ao ligando H18/7
LP AAV-PEG	Lipossomas contendo rAAV conjugados a moléculas de PEG não acopladas a qualquer ligando
LP Ad-H18/7	Lipossomas contendo rAd conjugados ao ligando H18/7
LP Ad-PEG	Lipossomas contendo rAd conjugados a moléculas de PEG não acopladas a qualquer ligando
LP-H18/7	Lipossomas “vazios” conjugados ao ligando H18/7
LP- PEG	Lipossomas “vazios” conjugados a moléculas de PEG não acopladas a qualquer ligando
LPPX	Lipopoliplexo
LPPX-H18/7	Lipopoliplexos conjugados ao ligando H18/7
LPPX-PEG	Lipopoliplexos conjugados a moléculas de PEG não acopladas a qualquer ligando
LP- Tf	Lipossomas “vazios” conjugados ao ligando transferrina
LTR	Repetições terminais longas <i>Long terminal repeats</i>
Mal	Maleimida
MES-1	Anticorpo de rato anti-E-selectina de ratinho
MHC I	Complexo maior de histocompatibilidade-I <i>Major histocompatibility complex-I</i>

MLV	Vírus de leucemia murínica <i>Murine leukemia virus</i>
MMP	Metaloproteinases da matriz <i>Matrix metalloproteinases</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida
NHS-PEG-Mal	Molécula de polietilenoglicol de peso molecular 3 500 conjugada a dois grupos funcionais: um grupo n-hidroxisuccinimida e um grupo maleimida
NLS-H1	Sinal de localização nuclear do antígeno T do vírus SV40 conjugado com a histona humana H1
NF-kB	Factor nuclear kB <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	Linfócitos natural killer
NLS	Sinal de localização nuclear <i>Nuclear localization signal</i>
N/P	Razão molar entre grupos amina (N) de PEI e grupos fosfato (P) do ADN
NTP	Nucleótidos trifosfato <i>Nucleotides triphosphate</i>
ODN	Oligodesoxinucleótidos
ONGP	O-nitrofenil galactopiranósido
ORI	Origem de replicação
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	Tampão fosfato salino <i>Phosphate buffer saline</i>
PBST	Tampão PBS contendo <i>tween</i> a 0,2 %
pCMV	Promotor do citomegalovírus
pCMVLacZ	Plasmídeo contendo o gene codificador da β -galactosidase sob o controlo do promotor do citomegalovírus
PCR	Reacção de polimerização em cadeia <i>Polymerase chain reactions</i>

PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas <i>Platelet derived growth factor</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina
PEI/ADN	Políplexos de polietilenimina e ADN
PFA	Paraformaldeído Paraformaldehyde
PI	Fosfatidilinositol <i>Phosphatidylinositol</i>
PMAA	Ácido polimetacrílico <i>Polymethacrylic acid</i>
rAAV	Vírus adeno-associados recombinantes <i>Recombinant adeno-associated virus</i>
rAd	Adenovírus recombinantes <i>Recombinant adenovirus</i>
R10 ou R38	Razão molar entre grupos amina do polímero PEI e grupos fosfato do ADN
REV	Método de evaporação em fase reversa <i>Reverse evaporation method</i>
REV/FT	Método de evaporação em fase reversa-congelamento/descongelamento <i>Reverse evaporation method/Freeze-thawing</i>
RGD	Motivos Arginina-Glicina-Ácido aspártico
Rh-PE	N-(lissamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina <i>1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl)</i>
SH	Grupo sulfidrilo ou tiol
S/MARS	Regiões de ligação da matriz <i>Scaffold/matrix attachment regions</i>
SSR	Recombinase específica de determinada sequência <i>Site specific recombinase</i>

SV40	Vírus de símios 40 <i>Simian vacuolating virus 40 or Simian virus 40</i>
SCID X	Imunodeficiência severa combinada ligada ao cromossoma X <i>X-linked Severe Combined Immunodeficiency</i>
ssADN	ADN de cadeia simples <i>Single stranded DNA</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tf	Holo-transferrina humana
TIMP	Inibidores de metaloproteinases <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF-α	Factor de necrose tumoral- α <i>Tumor necrosis factor-α</i>
TSP-1	Trombospondina-1 <i>Thrombospondin-1</i>
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular <i>Vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil β -D-galactopiranosose

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Sérgio Simões pelas sugestões e orientação desta tese.

À Professora Maria Conceição P. de Lima pelo apoio e co-orientação desta tese.

Ao Professor Mauro Giacca pelo acompanhamento constante e ajuda científica que prestou ao longo dos meses que frequentei o seu laboratório.

À Universidade de Coimbra pela aceitação da minha candidatura a aluna de Doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento concedido através de bolsa de doutoramento SFRH/BD/9092/2002 e do projecto POCTI/BIO/48735/2002.

Aos meus colegas e amigos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, do Centro de Neurociências e Biologia Celular e Molecular e do *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)*, por todo o apoio e amizade.

Aos colaboradores directos neste projecto, nomeadamente Jan Kamps, Grietje Molema e Eduardo Ayuso, por todo o suporte técnico e simpatia.

Finalmente, é com todo o sentimento que agradeço ao Vítor Magueijo, à Teresa Girão, à Isabel Nunes, à Márcia Carneiro e aos meus pais e familiares mais próximos pelo fantástico apoio que me deram durante todos estes anos.

