

ALLAN RADAIC

“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA  
CARREAMENTO CONJUNTO DO GENE PARA PTEN E  
MITOXANTRONA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E DE  
PRÓSTATA”

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA  
CARREAMENTO CONJUNTO DO GENE PARA PTEN E MITOXANTRONA EM  
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Allan Radaic*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Funcional e Molecular,  
na área de Bioquímica.

**Aluno:** Allan Radaic

**Orientadora:** Profa. Dra. Eneida de Paula

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R116d	<p>Radaic, Allan, 1986- Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para o carreamento do gene para PTEN e mitoxantrona em células de câncer de mama e de próstata / Allan Radaic. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Eneida de Paula. Coorientador: Marcelo Bispo de Jesus. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 3. Gene PTEN. 4. Mitoxantrona. 5. Câncer. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Jesus, Marcelo Bispo de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Development of lipidic nanoparticles for PTEN gene and mitoxantrone delivery in breast and prostate cancer cells

**Palavras-chave em Inglês:**

Solid lipid nanoparticles  
Nanostructured lipidic carriers  
PTEN gene  
Mitoxantrone  
Cancer

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Eneida de Paula [Orientador]  
Amedea Barozzi Seabra  
Ana Carolina Santos de Souza Galvão

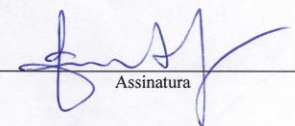
**Data da defesa:** 18-07-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

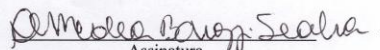
Campinas, 18 de Julho de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

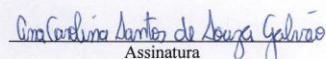
Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Amedea Barozzi Seabra

  
Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão

  
Assinatura

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por me dar esta oportunidade ímpar na minha vida, onde pude aprender muito e à Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eneida de Paula, por toda sua compreensão, carinho, paciência, disposição e tudo mais requerido neste período. Agradeço, também a Prof.<sup>ª</sup> Dra Carmen Veríssimo Ferreira, por me ajudar nos experimentos de cultura de células sempre que precisei, ao Dr. Marcelo Bispo de Jesus, por toda sua dedicação neste projeto e por me ensinar tudo que precisei.

Aos meus pais (Rosely e Reinaldo) por toda a dedicação durante toda a minha vida; ao meu Irmão Andrew pela compreensão, ajuda e carinho todo esse tempo e à minha namorada Natália por me ouvir, me aguentar e me amar!

Aos meus avós (Pedro, Elza e Vô Jozias, *in memoriam*) por todo o carinho e atenção que me deram, e a quem agora eu posso retribuir um pouquinho de tudo que passaram para mim, assim como meu tio Sérgio, Léo, minha tia Patrícia, Ricardo e os bebês Gustavo e Fabiano.

Não poderiam faltar os meus agradecimentos à Giovana, Gabriel, Kelly, Alessandro, Rafa, Vanessa, Will Richard, Carol e Wil Silva por todas as risadas e todo o tempo que passamos juntos.

Agradeço também a todos que conheci na UNICAMP: a Bruna, Cleyton, Vivi Queiróz, Cintia Cereda, Michelle, Sheila, Lívia, Danilo, Mário e a Camila, sem esquecer o pessoal de Sorocaba: Léo, Nathalie e o Grillo. Em especial, queria agradecer aos biotecnólogos Diego e Taciani, que me fizeram crescer profissionalmente excepcionalmente. Agradeço aos Técnicos do Laboratório de Biomembranas, Márcio e Maribel, pelo período que pude aprender com eles, fora suas amizades.

Meus agradecimentos, também, a todo pessoal que conheci na Holanda: Inge, Swen, Julia, Katica, Ina (que me ensinou muito com toda sua experiência e atualidade apesar da idade), ao Zia pela grande amizade e disposição, sempre quando precisava. Ao Dr. Dick Hoesktra, por ter aberto esta oportunidade única e por me ajudar a crescer nesta área.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro neste período de Mestrado (Processo FAPESP no. 2009/13110-3).

*“O que se descobre ser ao pensar, precisa de um mundo para aterrissar, precisa que haja alguém que faça pensar valer a pena. Alguém que, ao fim, é de onde se pensa, e se ele não existe, então nada existe, porque o que pensa não tem como pensar a partir de si.”*

**René Descartes.**

## Resumo

O câncer é a doença genética responsável pelo maior número de mortes em países desenvolvidos e a segunda maior *causa mortis* em países em desenvolvimento. Uma das principais formas de tratamento do câncer é a quimioterapia, que se utiliza de fármacos para induzir a morte em células cancerígenas, impedindo, assim, seu crescimento anormal. Para ultrapassar desvantagens dos tratamentos atuais, novas terapias vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas, a terapia gênica e o uso de sistemas de liberação de fármacos foram as abordagens escolhidas em nossa pesquisa. Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) e Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) são alternativas interessantes para viabilizar tais terapias, por conseguirem entregar material genético de forma efetiva e segura de genes, fármacos e proteínas em células alvo. Portanto, esta dissertação teve por objetivos i) desenvolver e aperfeiçoar um novo método de produção de CLN e NLS: a extrusão de microemulsão e ii) produzir nanopartículas capazes de carrear genes (gene codificante para PTEN) e fármacos (mitoxantrona) concomitantemente em células de câncer. Os resultados demonstram que a extrusão de microemulsão é um método factível para a produção de tais partículas, sendo que 15 passagens pela membrana de 100 nm, 5 °C acima da temperatura de fusão dos lipídios sólidos são os melhores parâmetros para otimização deste processo. As nanopartículas lipídicas produzidas apresentaram diâmetro médio em torno de 140 nm e foram estáveis por, pelo menos, 180 dias estocadas a 4 °C. Além disso, CLN e NLS mostraram-se semelhantes quanto ao tamanho, potencial Zeta e polidispersão (PDI). Apesar de não apresentarem diferenças quanto a transição de fase, as nanopartículas lipídicas apresentaram uma ultraestrutura monolítica bastante distinta dos lipossomas, o que garantiu uma alta eficiência de encapsulamento para o fármaco mitoxantrona: de 81% em CLN e 64 % em NLS. Finalmente, o carregamento concomitante do fármaco mitoxantrona e do gene da PTEN diminuiu a viabilidade celular em linhagens de câncer de mama (MCF-7) e de próstata (PC3), de maneira mais eficiente que formulações lipossomais.

## Abstract

Cancer is the genetic disease responsible for major death causes in developed countries and it is the second leading cause of death in developing countries. One of the main forms of cancer treatment is chemotherapy, which uses drugs to induce death in neoplastic cells, thereby preventing their overgrowth. To overcome disadvantages of current treatments, new therapies have been developed. Among them, gene therapy and the use of drug delivery systems were the approaches used in our research. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN) are suitable carriers for such therapies since they can effectively and safely deliver genetic material, drugs and proteins in target cells. Therefore, this work was aimed i) to develop and optimize a new method of production of NLC and SLN: the microemulsion extrusion and ii) to produce nanoparticles capable of co-delivery genes (the coding gene for PTEN) and drugs (mitoxantrone) into cancer cells. The results demonstrate that microemulsion extrusion is a reliable method for the production of such particles, being 15 passages through 100 nm membrane, at 5 °C above the solid lipid melting temperature, are the best parameters for process optimization. The lipid nanoparticles showed average diameter of 140 nm and they were stable up to 180 days of storage at 4 °C. Moreover, NLC and SLN showed similar size, Zeta potential and polydispersity (PDI). While calorimetry did not reveal great differences among the formulations tested, transmission electron microscopy revealed a monolithic structure for lipid nanoparticles distinct from liposomes, which allowed NLC and SLN to encapsulate 81 and 64 %, respectively, of mitoxantrone. Finally, concomitant entrapment of mitoxantrone and PTEN gene in lipid nanoparticles led to a decrease in the cell viability of breast (MCF-7) and prostate (PC3) cancer cells, more efficiently than liposomal formulations.



## Lista de Abreviaturas

ABC – Cassete de ligação de ATP

Balb/3T3 – Linhagem celular de fibroblasto de camundongo Balb/C

CLN – Carreador Lipídico Nanoestruturado

DAPI – 4,6–diamidino-2-fenilindol

IC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular

DMPC - Dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DNAp – (*Deoxiribonucleic Acid plasmid*) Ácido desoxirribonucleico plasmidial

DNase I – Enzima degradadora de ácido nucleico tipo I

DOPE – 1,2 dioleoil 3-fosfatidiletanolamina

DOTAP – 1,2 dioleoil propano 3-trimetilamônio

DSC – (*Differential Scanning Calorimetry*) Calorimetria diferencial de varredura

EMSA – (*Electroforetic Mobility Shift Assay*) Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética

EPC – (*Egg Phosphatidylcholine*) Fosfatidilcolina de ovo

FACS – (*Fluorescent-Activated Cell Sorting*) Citometria de fluxo

HIV – (*Human Immunodeficiency Virus*) – Vírus da imunodeficiência humana

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Lip – Lipossoma

MCF-7 – Linhagem celular de câncer de mama humano

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

MTX – Mitoxantrona

NLS – Nanopartícula Lipídica Sólida

PAMAM – Poliamidoaminas

P-gp – (*P-glycoprotein*) Glicoproteína-P

PBS – (*Phosphate Buffered Saline*) Tampão Fosfato Salino

PC3 – Linhagem celular de carcinoma de próstata humano

PDI – (*Polydispersion Index*) Índice de Polidispersão

PEG – Poli-Etileno Glicol

PEI – Polietilenimina

PGA – (*Poly Glicolic Acid*) Poli-ácido Lático

PLA – (*Poly Latic Acid*) Poli-ácido Lático

PLGA – (*Poly Latic Glicolic Acids*) Poli-ácidos Lático e Glicólico

PLL – Poli-L-Lisina

PTEN – (*Phosphatase and Tensin homolog*) Proteína Fosfatase homologa à Tensina

SDS – (*Sodium Dodecyl Sulfate*) Dodecil sulfato de sódio

Tf+X°C – Temperatura X°C acima da temperatura de fusão dos lipídios sólidos

W<sub>c</sub> – Cristalinidade da nanopartícula

# Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Câncer</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Fármacos e Terapias</b>	<b>4</b>
1.2.1. Carreamento de Fármacos ( <i>Drug Delivery</i> )	5
1.2.2. Terapia gênica (Gene therapy)	6
<b>1.3. Nanocarreadores</b>	<b>8</b>
1.3.1. Carreadores virais	8
1.3.2. Carreadores não virais	9
<b>1.4. Métodos de preparação</b>	<b>14</b>
1.4.1. Homogeneização à alta pressão	14
1.4.2. Microemulsão à quente	15
<b>2. Objetivos Principais</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivos específicos	18
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>19</b>
3.1. Preparação dos Lipossomas de EPC, CLN, Lipossomas de DOTAP e NLS e lipoplexos	19
3.2. Otimização da Extrusão de Microemulsão	23
3.3. Estabilidade Físico-química das Formulações Produzidas	24
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	24
3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	25
3.6. Ensaio de Liofilização	25
3.7. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	25
3.8. Ensaio de Proteção contra DNase I	26
3.9. Encapsulação de Mitoxantrona	26
3.10. Liberação <i>in vitro</i> de mitoxantrona	28
3.11. Cultura de células	28
3.11.1. Seleção de células MCF-7 resistentes à mitoxantrona	28
3.12. Viabilidade Celular	29
3.13. Análise Estatística	29

<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>30</b>
4.1. Extrusão de microemulsão para produção de nanopartículas lipídicas	30
4.2. Produção de nanopartículas por extrusão de microemulsão	44
4.3. Estabilidade físico-química das formulações produzidas	46
4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	50
4.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	53
4.7. Carreamento de Fármacos ( <i>Drug Delivery</i> )	59
4.8. Carreamento de genes ( <i>gene delivery</i> )	65
4.9. Teste de Viabilidade Celular	67
<b>5. Conclusões</b>	<b>78</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>80</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>81</b>
<b>Apêndice I: Currículo Lattes de Allan Radaic</b>	<b>93</b>

## Índice de Figuras

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA MITOXANTRONA .....	5
FIGURA 2 - LIPOSSOMAS, NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS) E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN) E SUAS ESTRUTURAS.....	11
FIGURA 3 - TRANSIÇÃO POLIMÓRFICA OBSERVADA EM NLS OCASIONANDO A EXPULSÃO DE MOLÉCULAS ATIVAS INCORPORADAS NA MATRIX LIPÍDICA (BURST EFFECT) .....	13
FIGURA 4- PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS POR EXTRUSÃO DE MICROEMULSÃO.....	16
FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS, CLN E NLS: 1,2 -DIOLEOIL-3-TRIMETILAMÔNIO PROPANO (DOTAP); ÁCIDO ESTEÁRICO; PLURONIC F68; FOFASTIDILCOLINA DE OVO* E MONOESTEARATO DE GLICERILA. ....	22
FIGURA 6 – CURVA PADRÃO DE MITOXANTRONA . ABSORBÂNCIA A 672NM FOI DETERMINADA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MITOXANTRONA (0 A 10 MMOL.L <sup>-1</sup> ). ....	27
FIGURA 7 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE PASSAGENS PELA MEMBRANA DE EXTRUSÃO DE 100 NM.....	33
FIGURA 8 - VARIAÇÃO DO POTÊNCIAL ZETA DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE PASSAGENS PELA MEMBRANA DE 100NM.....	34
FIGURA 9 - VARIAÇÃO DO PDI DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE PASSAGENS PELA MEMBRANA DE 100 NM. ....	36
FIGURA 10- DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DO SISTEMA COM INCREMENTOS DE 5°C ACIMA DA TEMPERATURA DE FUSÃO (T <sub>f</sub> ) DOS LIPÍDIOS SÓLIDOS... 40	40
FIGURA 11 - POTÊNCIAL ZETA (mV) DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DO SISTEMA COM INCREMENTOS DE 5°C ACIMA DA TEMPERATURA DE FUSÃO (T <sub>f</sub> ) DOS LIPÍDIOS SÓLIDOS. ....	41
FIGURA 12 - PDI DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DO SISTEMA COM INCREMENTOS DE 5°C ACIMA DA TEMPERATURA DE FUSÃO (T <sub>f</sub> ) DOS LIPÍDIOS SÓLIDOS.. ....	43
FIGURA 13 - ESTABILIDADE DO DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS AO LONGO DE 180 DIAS (6 MESES).....	47
FIGURA 14 - ESTABILIDADE DO PDI DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS AO LONGO DE 180 DIAS (6 MESES) .....	48
FIGURA 15 - ESTABILIDADE DO POTENCIAL ZETA DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS AO LONGO DE 180 DIAS (6 MESES).....	49
FIGURA 16 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET): A) LIPOSSOMAS DE EPC; B) CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN); C) LIPOSSOMAS DE DOTAP; D) NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS).....	52
FIGURA 17- MEDIDAS DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC), DE AMOSTRAS DE: MONOESTEARATO DE GLICERILA, EPC, CLN, PLURONIC F68, ÁCIDO ESTEÁRICO, DOTAP E NLS.....	55
FIGURA 18 – PORCENTAGEM DE MITOXANTRONA CARREGADA NOS VEÍCULOS: LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS.....	63
FIGURA 19 – CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE MITOXANTRONA LIVRE E CARREGADA POR LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM TAMPÃO PBS, PH 7,4 À TEMPERATURA AMBIENTE.....	64
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DNAP COM OS VEÍCULOS: LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM GEL DE AGAROSE 1,3%.....	66
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA ENZIMAS DEGRADADORAS DE DNA (DNASE I) DAS AMOSTRAS: DNAP LIVRE SEM (-) E COM (+) DNASE I, SEGUIDO PELO DNAP COM CARREADORES: LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM GEL DE AGAROSE 1,3%.....	66
FIGURA 22 - CURVA DOSE-RESPOSTA DAS LINHAGENS CELULARES BALB/3T3, PC3, MCF-7 SUSCEPTÍVEL E MCF-7 RESISTENTE, MEDIDA PELO TESTE DE MTT.....	68
FIGURA 23 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS EMBRIÔNICOS DE CAMUNDONGO (BALB/3T3) TRATADOS COM LIPOSSOMAS DE DOTAP VAZIOS (LIP. DOTAP); NLS VAZIA (NLS); 10 μMOL.L <sup>-1</sup> DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 μMOL.L <sup>-1</sup> DE MITOXANTRONA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP MTX); 10 μMOL.L <sup>-1</sup> DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM NLS (NLS MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM NLS (NLS	

PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM NLS (NLS CONJUGAÇÃO)....	70
FIGURA 24 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS EMBRIÔNICOS DE CAMUNDONGO (BALB/3T3) TESTADOS COM LIPOSSOMAS DE EPC VAZIOS (LIP. EPC); CLN VAZIA (CLN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC MTX); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM CLN (CLN MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM CLN (CLN PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM CLN (CLN CONJUGAÇÃO).....	71
FIGURA 25 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CARCINOMA DE PRÓSTATA (PC3) TRATADAS COM LIPOSSOMAS DE DOTAP VAZIOS (LIP. DOTAP); NLS VAZIA (NLS); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP MTX); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM NLS (NLS MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM NLS (NLS PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM NLS (NLS CONJUGAÇÃO). ....	73
FIGURA 26 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CARCINOMA DE PRÓSTATA (PC3) TRATADAS COM LIPOSSOMAS DE EPC VAZIOS (LIP. EPC); CLN VAZIA (CLN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC MTX); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM CLN (CLN MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM CLN (CLN PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM CLN (CLN CONJUGAÇÃO). ....	74
FIGURA 27 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (MCF-7 RESISTENTE) TRATADAS COM LIPOSSOMAS DE DOTAP VAZIOS (LIP. DOTAP); NLS VAZIA (NLS); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP MTX); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM NLS (NLS MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM NLS (NLS PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE DOTAP (LIP. DOTAP CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM NLS (NLS CONJUGAÇÃO).....	75
FIGURA 28 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (MCF-7 RESISTENTE) TRATADAS COM LIPOSSOMAS DE EPC VAZIA (LIP. EPC); CLN VAZIA (CLN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA LIVRE (MTX); PLASMÍDEO DE PTEN LIVRE (PTEN); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC MTX); 10 $\mu\text{MOL.L}^{-1}$ DE MITOXANTRONA ENCAPSULADA EM CLN (CLN MTX); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC PTEN); PLASMÍDEO DE PTEN ENCAPSULADO EM CLN (CLN PTEN); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM LIPOSSOMAS DE EPC (LIP. EPC CONJUGAÇÃO); ENCAPSULAÇÃO CONJUNTA DE MITOXANTRONA E PLASMÍDEO DE PTEN EM CLN (CLN CONJUGAÇÃO).....	76

## Índice de Tabelas

TABELA 1 - PORCENTAGEM DOS 10 MAIS INCIDENTES TIPOS DE CÂNCER NO MUNDO EM HOMENS E MULHERES, ADAPTADO DE SIEGEL (2012).....	2
TABELA 2 - RELAÇÃO DE PREÇOS (EM DÓLARES AMERICANOS, US\$) PARA PRODUÇÃO DAS CLN E NLS DESENVOLVIDAS NESTA DISSERTAÇÃO, POR HOMOGENEIZAÇÃO A ALTA PRESSÃO (20ML) E EXTRUSÃO DE MICROEMULSÃO (0,2ML).....	17
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS À PARTIR DE ÁCIDO ESTEÁRICO, DOTAP, PLURONIC F68, MONOESTEARATO DE GLICERILA E FOSFATIDILCOLINA DE OVO (EPC). .....	19
TABELA 4 – TEMPERATURAS DO SISTEMA DE MICROEMULSÃO TESTADAS NA OTIMIZAÇÃO DA FABRICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E LIPOSSOMAS, DESIGNADAS POR Tf+5°C; Tf+10°C E Tf+15°C. ....	24
TABELA 5 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO, POTENCIAL ZETA E PDI DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS, TODAS FABRICADOS A Tf+5°C, EM RELAÇÃO AO NUMERO DE PASSAGENS PELA MEMBRANA DE 100NM.....	32
TABELA 6 - VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS EM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE FUSÃO (T <sub>f</sub> ) DOS RESPECTIVOS LIPÍDIOS SÓLIDOS. ....	38
TABELA 7- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS PRODUZIDAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE EXTRUSÃO DE MICROEMULSÃO COM 15 PASSAGENS E Tf+5°C. ....	45
TABELA 8 - LIOFILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS COM E SEM CRIOPROTETOR (TREALOSE E SACAROSE) E SUA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA POR DIÂMETRO MÉDIO, POTENCIAL ZETA E POLIDISPERSÃO (PDI) .....	57
TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS DE EPC, CLN, LIPOSSOMAS DE DOTAP E NLS PRODUZIDOS COM E SEM MITOXANTRONA.....	61

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer

O câncer é a doença genética responsável pelo maior número de mortes em países desenvolvidos e a segunda *causa mortis* em países em desenvolvimento. Em 2008, a estimativa do Centro Nacional de Estatísticas em Saúde (*National Center for Health Statistics*) era de 12 milhões de novos casos e segundo Instituto Nacional de Câncer, (*National Cancer Institute*) em associação com Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*) em todo o mundo seriam 7,6 milhões de mortes causadas em consequência do câncer (Siegel *et al.*, 2012). Estima-se que o número de novos casos de câncer continue a crescer em decorrência do envelhecimento da população mundial, podendo chegar a 15 milhões de novos casos em 2020 (Schneider, 2012). Somado a isso, a adoção cada vez maior de estilos de vida associados ao risco de desenvolver câncer, incluindo-se fatores como fumo, ingestão de álcool, sedentarismo, obesidade e dietas *fast-food*, suporta a hipótese de que o número de novos casos tende a aumentar (Jemal *et al.*, 2011; Schneider, 2012).

No Mundo, o câncer de mama é o mais diagnosticado entre as mulheres, com 29 % (2,26 milhões/ano) de todos os tipos de câncer, além de ser a segunda principal causa de morte por esta doença, representando 19 % (395.100/ano) das mortes (Jemal *et al.*, 2011). Já entre os homens, em todo o mundo o câncer de próstata é o mais diagnosticado, com 29 % (2,41 milhões/ano) de todos os casos e é a segunda causa de morte, com 9 % (281.700/ano de mortes) (Siegel *et al.*, 2012), como demonstra a Tabela 1.



*Tabela 1 - Porcentagem dos 10 mais incidentes tipos de câncer no mundo em homens e mulheres, adaptado de Siegel (2012)*

	Homens		Mulheres	
	Incidência	Mortes	Incidência	Mortes
<b>Próstata</b>	29%	9%	-	-
<b>Mama</b>	-	-	29%	14%
<b>Pulmão</b>	14%	29%	14%	26%
<b>Cólon e reto</b>	9%	9%	9%	9%
<b>Bexiga</b>	7%	3%	5%	2%
<b>Útero</b>	-	-	6%	3%
<b>Tireóide</b>	5%	2%	5%	2%
<b>Melanoma</b>	5%	2%	4%	2%
<b>Linfoma não-Hodkin</b>	4%	3%	4%	3%
<b>Leucemia</b>	3%	4%	2%	4%

Já no Brasil, o Instituto Nacional do Cancer (INCA) estima, para o biênio 2012-2013, o câncer de mama como sendo o mais incidente entre mulheres, com 27,9 % do total de novos casos (52.680 de novos casos por ano), enquanto que o câncer de próstata como o mais incidente entre os homens, com 30,8 % do total de novos casos (60.180 de novos casos por ano).

Uma das formas mais comuns de tratamento do câncer é através da quimioterapia, a qual visa matar células de câncer e impedi-las de continuar seu crescimento anormal com o uso de fármacos citotóxicos (Hahn *et al.*, 2012; Macdonald, 2012). Entretanto, esta terapia possui algumas desvantagens e limitações, como a acessibilidade limitada dos ativos aos tecidos tumorigênicos, justificando assim a necessidade de altas doses terapêuticas que causam efeitos colaterais desagradáveis nos pacientes, que vão desde náusea até a perda dos pelos corporais (Parveen e Sahoo, 2008).

Somado a isso, a exposição sucessiva das células tumorais a esse tratamento pode levar a sobrevivência seletiva de células resistentes ao tratamento com o quimioterápico (Raguz & Yagüe, 2008). Dois mecanismos contribuem para o desenvolvimento da resistência. Um deles está relacionado com fatores farmacológicos e fisiológicos, como metabolismo dos ativos e sua excreção, assim como o acesso insuficiente do fármaco ao tumor (Raguz & Yagüe, 2008). O outro mecanismo está relacionado com fatores celulares, que incluem: um cassete genético super-expresso da superfamília de transportadores transmembranares ligantes de ATP (ABC), incluindo a glicoproteína-P (P-gp); mudanças na atividade da topoisomerase II; expressão diminuída de proteínas associadas à apoptose e de proteínas ligantes de fármacos anticâncer (Litman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008).

A super-expressão da superfamília de transportadores membranares possui um papel fundamental na resistência aos fármacos anticâncer, bombeando xenobióticos e elementos prejudiciais às células para a matriz extracelular, através de transporte ativo. Geralmente, esta super-expressão é demonstrada na classe de transportadores do cassete de ligação de ATP (ABC) e, em especial, a P-gp em cânceres como o de mama (Giacomini & Sugiyama, 2006; Liu *et al.*, 2008).

A Topoisomerase II é uma proteína necessária ao ciclo celular, responsável pela abertura e fechamento da cadeia de dupla-hélice do DNA nuclear e, por isto, diversos fármacos são direcionados a ela, para impedir sua atividade celular, ocasionado retardo no ciclo celular e inibindo, assim, a proliferação de células cancerígenas. A Mitoxantrona, por exemplo, é um quimioterápico que age inibindo a topoisomerase II, interrompendo o ciclo celular. Entretanto, mudanças na atividade da topoisomerase II a mantem ativa mesmo ante a fármacos inibitórios (Liu *et al.*, 2008), podendo ocasionar resistência a tais fármacos.

Além disso, algumas proteínas associadas à apoptose, como a p53 e a Proteína Fosfatase homóloga à Tensina (PTEN), podem ter sua expressão modificada (expressão reduzida ou mesmo tendo o gene deletado do genoma da célula). Essas proteínas tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular e, portanto, essa

expressão alterada pode prejudicar a capacidade de induzir apoptose nas células cancerígenas (Igney & Krammer, 2002).

Proteínas ligantes de fármacos são produzidas como resposta celular a choques quimioterápicos, tendo a finalidade de impedir o fármaco de ligação ao seu sítio específico de atuação (Allardyce *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008).

Frente a tais problemas, faz-se necessária a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e terapias capazes de suprimir a resistência das células ao tratamento contra o câncer.

## **1.2. Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Fármacos e Terapias**

A Pesquisa e o Desenvolvimento de novos fármacos é um ramo de negócios muito custoso (levando cerca de 15 anos desde a identificação de um novo ativo até seu uso em pacientes), pois são pesquisados centenas de novos ativos por mês, por cada empresa farmacêutica. Entretanto, estima-se que apenas 1 dentre 10.000 possíveis fármacos chegam ao uso clínico. Muitos fármacos falham na fase pré-clínica, por não conseguirem chegar a seus respectivos órgãos-alvos, espalhando-se por todos os tecidos do paciente (Gassman *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2011).

Com isto, o uso de doses clínicas repetidas, em concentrações limites de biotoxicidade se faz necessário para suprimir a perda decorrente da biodistribuição dos ativos, o que pode levar a efeitos colaterais para o paciente, assim como provocar a resistência celular ao tratamento, devido à exposição a doses sucessivas (Sato *et al.*, 2011). O uso repetido constitui um dos motivos pelos quais os fármacos contra câncer possuem grau de cura limitado (Demeure *et al.*, 2012).

Portanto, apenas o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para garantir a eficácia do tratamento de doenças, especialmente o câncer, fazendo-se necessária a adoção de novas estratégias terapêuticas. Dessas, terapias como o carregamento de fármacos e de genes são promissoras para uma ação terapêutica mais eficiente, para melhorar a biodistribuição de ativos, e auxiliar na transposição de barreiras biológicas (biomembranas) (Charcosset *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010; Demeure *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Carreamento de Fármacos (*Drug Delivery*)

O carreamento de fármacos (*Drug Delivery*) baseia-se no uso de um carreador macromolecular (como lipossomas, nanopartículas, micropartículas, ciclodextrinas, entre outros) capaz de interagir com o ativo. Essa interação pode alterar propriedades físico-químicas de ativos e fazer, por exemplo, com que a dose terapêutica do mesmo seja liberada de forma sustentada ao longo do tempo e, preferencialmente, diretamente no tecido-alvo. Evitando, assim, doses excessivas e picos plasmáticos, além de auxiliar a passagem por múltiplas barreiras biológicas. Por isto, sistemas de liberação sustentada possuem potencial para melhorar as terapias farmacêuticas atuais, as quais são baseadas na duplicidade dose-resposta dos pacientes, muitas vezes ocasionando efeitos colaterais não desejados (Alexis *et al.*, 2008a).

Dentre os agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, a classe das antracenodionas é uma das mais estudadas devido à sua notável eficiência clínica contra diversos tipos de câncer, tais como melanomas, leucemias, câncer de ovário, de próstata e de mama (Li *et al.*, 2005). Seu mecanismo de ação envolve intercalação nas cadeias de DNA, inibição da topoisomerase II e, conseqüentemente, inibição da duplicação do DNA na fase S do ciclo celular (Stanisz *et al.*, 2012).

Um dos integrantes dessa família é a mitoxantrona (MTX) (Figura 1), que se destaca por ser um potente inibidor de topoisomerase II, além de possuir a capacidade de interferir na síntese de RNA através da quebra de ligações cruzadas entre as fitas de DNA (Goodin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

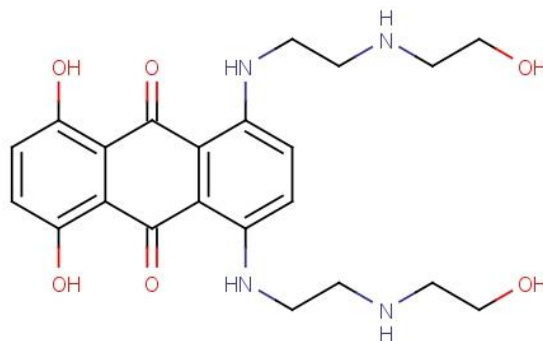


Figura 1- Fórmula estrutural da Mitoxantrona

Contudo, a mitoxantrona exibe grande toxicidade sistêmica, mesmo quando administrado em pequenas doses, bem como baixa especificidade celular, apresentando efeitos citotóxicos tanto em células proliferativas quanto em não proliferativas, o que pode limitar sua administração pela via intravenosa (Almond *et al.*, 2003; Mulroy *et al.*, 2012).

Há que se considerar ainda que doenças como o câncer, a hemofilia e a hemocromatose, são causadas por genes deficientes, que causam menor expressão de proteínas como a p53 e a PTEN ou super-expressão de outras, como a proteína quinase B (Akt), família RAS e a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), as quais são responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular. Para estas doenças, o tratamento farmacológico convencional (por não corrigir tais defeitos genéticos) pode ocasionar a recorrência crônica da patologia (Roth & Cristiano, 1997; Shook & Campana, 2011; Brenner, 2012). Na tentativa de reverter esse quadro, significativos avanços em tecnologia de transferências de genes foram desenvolvidos na última década, oferecendo novas ferramentas para o tratamento do câncer como o carregamento genético em nanocarreadores (Casucci *et al.*, 2012).

### **1.2.2. Terapia gênica (Gene therapy)**

Conceitualmente, a terapia gênica consiste na correção da expressão de proteínas (suprimidas ou super-expressas) em determinadas células ou tecidos, seja a partir da indução de expressão dos genes suprimidos (Verma *et al.*, 2000; Sheridan, 2011).

Tal terapia pode ser utilizada para o tratamento de câncer, utilizando genes recombinantes para ampliar as terapias existentes, como por exemplo, vacinas gênicas como imunoterapêuticos, que possuem direcionamento específico para células danificadas, protegendo as normais, ou para tornar células resistentes em células sensíveis à quimioterapia (Blaese *et al.*, 1995; Roth & Cristiano, 1997; Tanaka & Grossman, 2003; Sher *et al.*, 2011). A indução da expressão de proteínas que se encontram não funcionais ou mesmo que tenham o seu gene deletado do genoma na

célula é uma das principais técnicas utilizadas para a terapia do câncer (Sher *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes tipos de câncer, uma das proteínas com potencial uso para terapia gênica é a Proteína Fosfatase homóloga à Tensina (PTEN), que seu gene se mostra deletado ou codifica a expressão de uma proteína disfuncional em especial no câncer de próstata e mama, implicando em super-expressão da proteína Akt e consequente excesso de proliferação celular (Ettl *et al.*, 2012; Sood *et al.*, 2012). A atividade de fosfatase da PTEN é fundamental na supressão de tumores e no controle da cascata de transdução de sinal da fosfatidilinositol 3' quinase (PI3'K), inibindo a ativação da Akt, uma serina-treonina quinase envolvida em cascatas de proliferação e sinais anti-apoptóticos (Tanaka & Grossman, 2003; Bartholomeusz & Gonzalez-Angulo, 2012).

A expressão induzida de PTEN em células deficientes desta proteína pode inibir a proliferação celular, levando à apoptose através da regulação da sobrevivência celular por esta proteína (Saito *et al.*, 2003; Anai *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2012). A literatura aponta que a expressão induzida de PTEN leva à inibição da proliferação e indução de apoptose em câncer colo-retal (Saito *et al.*, 2003; Sood *et al.*, 2012), câncer de bexiga (Tanaka & Grossman, 2003), câncer de próstata (Anai *et al.*, 2006) e câncer de mama (Cheney *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2007). Tanaka & Grossman (2003) demonstraram que a reintrodução do gene codificante da proteína PTEN reverteu a resistência à doxorubicina em células de câncer de bexiga, o que levou a eliminação completa do câncer em 30 % dos ratos tratados e inibição transiente do crescimento do tumor, por 120 dias nos 70 % restantes.

A associação de duas terapias pode ser uma alternativa interessante para o tratamento de doenças complexas como o câncer. Por exemplo, Anai e col. (2006) associaram duas terapias: a radioterapia e o carreamento do gene para PTEN em tumores de câncer de próstata (linhagem PC3) e obtiveram inibição do crescimento celular do tumor em ratos, indução de apoptose e perda de neovascularizações na região do tumor, o que não ocorreu com as terapias em separado. Isto demonstra uma possível ação sinérgica entre ambas as terapias. Da mesma forma, imaginamos que o

carreamento conjunto de genes e de fármacos poderão induzir resultados melhores que em separado. Contudo, este duplo carreamento só seria possível com a utilização de nanocarreadores, pois fármacos e genes apresentam características farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas, além do material genético, não possuir a capacidade intrínseca de ultrapassar barreiras biológicas (Liu *et al.*, 2009).

### **1.3. Nanocarreadores**

Nanocarreadores são plataformas naturais ou sintéticas, com tamanho entre 1-1000 nm, que possuem a capacidade de carregar moléculas com atividade biológica. Seu uso é promissor, pois possibilitam minimizar a toxicidade de tratamentos aos pacientes, melhorar a farmacocinética de ativos, e podem ainda melhorar a biodistribuição de agentes terapêuticos devido à acumulação preferencial no alvo (direcionamento tecido-específico e até, célula-específico). Devido a sua alta razão área de superfície:volume (Alexis *et al.*, 2008a; Ma *et al.*, 2012), os nanocarreadores melhoram a solubilidade e a estabilidade de pequenas moléculas, peptídeos e oligonucleotídeos, tornando-os aceitáveis para administração parenteral (Alexis *et al.*, 2008b; Mishra *et al.*, 2010). Os nanocarreadores devem ser capazes de permanecer na circulação sanguínea por períodos prolongados e, uma vez no interior celular, devem ser capazes de escapar do processamento endossômico-lisossômico (Müller *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2005; Kingsley *et al.*, 2006). Para *gene-delivery*, nanocarreadores naturais podem ser produzidos a partir de vírus recombinantes, os quais são bastante empregados. Já os sintéticos podem ser produzidos a base de biopolímeros, sistemas lipídicos (como lipossomas, carreadores nanoestruturados, e outros) tal que esses vetores são denominados de virais e não virais (Liu *et al.*, 2009), como será discutido em detalhe, a seguir.

#### **1.3.1. Carreadores virais**

Os vetores virais compõem-se de adenovírus, vírus adeno-associado ou lentivírus (da família dos retrovírus) modificados, e representam 67,2 % de todas as pesquisas em terapia gênica (Sheridan, 2011). Suas principais vantagens são o alto

nível de transfecção, transdução, grande seletividade dos alvos e boa indução da expressão do transgene (Verma *et al.*, 2000; Mcneish *et al.*, 2004; Simonelli *et al.*, 2010; Sheridan, 2011). McNeish e col. (2004) relataram estudos de fase clínica I/II, nos quais os genes para codificação de proteínas p53, PTEN e Rb (todas suprimidas por genes tumorigênicos) foram transfectados em pacientes, usando-se vetores de adenovírus, com eficiência de tratamento superior a 70 %.

Apesar de suas vantagens, há dificuldades no escalonamento e grande receio na aplicação clínica dos vetores virais, pois, uma vez reconhecidos pelo sistema imune, ativam respostas imunológicas e inflamatórias nos pacientes. Além disso, as proteínas virais possuem toxicidade intrínseca e limitam o tamanho do ácido nucleico carregado (Edelstein *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Há, pelo menos, um relato na literatura da morte de um paciente ocasionada por complicações envolvendo reação inflamatória ao vetor retroviral, em testes clínicos de fase II (Edelstein *et al.*, 2007). Por conta destas limitações, a busca por alternativas aos vetores virais é muito grande e vem sendo estudado utilizar-se carreadores não virais ou sintéticos.

### **1.3.2. Carreadores não virais**

Apesar da grande seletividade e alta taxa de transfecção induzida pelos vetores virais, suas desvantagens os tornam inseguros para uso em terapias gênicas (Edelstein *et al.*, 2007). Por outro lado, os vetores não virais são uma alternativa atraente, pois são de uso simples, fácil escalonamento e provocam baixa resposta imune específica. Atualmente, há uma diversidade de carreadores descritos, que podem ser divididos em carreadores poliméricos e lipídicos (Liu *et al.*, 2009).

#### **1.3.2.1. Carreadores poliméricos**

Nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros sintéticos ou naturais. Polímeros sintéticos são utilizados para aumentar a meia-vida de circulação da partícula e reduzir a absorção fagocitária, enquanto que polímeros naturais são utilizados devido à sua maior compatibilidade tecidual e por minimizar a citotoxicidade. Destacam-se, entre esses, os polímeros catiônicos, como os de polietilenimina (PEI),



poli-L-lisina (PLL), quitosana e poliamidoaminas (PAMAM), pois são utilizados para veicular material genético, com o qual estabelecem interações eletrostáticas (Liu *et al.*, 2010).

Além disso, o sistema de carreamento utilizando polímeros tem sido pesquisado com uma grande variedade de agentes terapêuticos, como: fármacos anticâncer, peptídeos, proteínas e vacinas recombinantes, assim como hormônios como a insulina (Damge *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2010). Para isso, formulações utilizando polímeros biocompatíveis como os de ácido lático (PLA), ácido glicólico (PGA) ou copolímeros de ambos (PLGA), são úteis, pois podem ser facilmente hidrolisados e removidos da circulação por vias metabólicas corporais (Koo *et al.*, 2005; Alexiset *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2010).

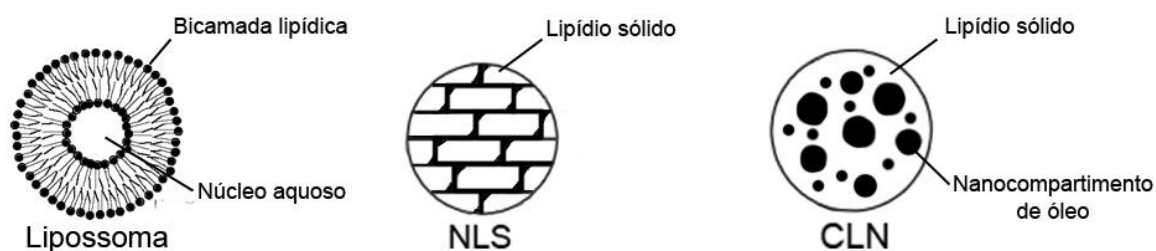
As principais vantagens do uso de polímeros biocompatíveis residem em serem biodegradáveis e mais estáveis que os carreadores lipídicos; além disso, existe a possibilidade de modificar tais polímeros, conferindo-lhes propriedades hemostáticas, bacteriostáticas, fungistáticas e anti-colesterolêmicas (Liu *et al.*, 2009). Em contrapartida, a inabilidade de controlar rigorosamente o processo de amalgamação do polímero durante a síntese pode produzir partículas com propriedades físico-químicas variáveis, o que dificulta seu processo de escalonamento, além da presença eventual de solvente orgânico residual (Karnik *et al.*, 2008), sendo estas as limitações mais comuns ao uso dos carreadores poliméricos.

### **1.3.2.2. Carreadores lipídicos**

Desde a descrição da primeira transfecção utilizando lipídios catiônicos por Felgner e colaboradores (1987), houve progresso significativo no estudo desses carreadores para entrega de genes. Um dos aspectos mais importantes para este progresso foi a síntese de lipídios catiônicos, como o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP), os quais possibilitaram a utilização de carreadores lipídicos como os lipossomas, para a transfecção de material genético (Li & Huang, 2000).

Os lipossomas foram descritos no início da década de 60, são formados por vesículas com uma ou mais bicamadas lipídicas, envolvido por água, tanto pelo meio

externo a partícula como em seu núcleo (Figura 2). Eles são produzidos pela simples agitação de lipídio ou mistura de lipídios em meio aquoso e são muito utilizados como modelo de membranas biológicas (Bangham, 1992). Foram introduzidos como sistema de carreamento no mercado de cosméticos pela Dior, em 1986 (Fassas & Anagnostopoulos, 2005; Torchilin, 2012) e são bastante utilizados como carreadores de fármacos (Torchilin, 2012). Diversos compostos com atividade anticâncer foram encapsulados em lipossomas como a mitoxantrona (Lim, et al., 1997) e a doxorubicina (Zhang et al., 2008).



*Figura 2 – Carreadores lipídicos: Esquema de alguns dos carreadores lipídicos mais utilizados Lipossomas, Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN).*

As principais vantagens do uso de lipossomas como carreadores são a redução da toxicidade de fármacos, em comparação com a forma convencional (fármaco livre), utilização tanto com moléculas lipofílicas como hidrofílicas, a possibilidade de administração intravenosa, além da utilidade do carreamento de agentes de diagnóstico, genes e até proteínas (Torchilin, 2012). Lipossomas já foram investigados para o carreamento de vacinas, toxóides, genes, diferentes fármacos inclusive para tratamento anticâncer, hepatite A e anti-HIV (Zhang et al., 2008). Podem ser modificados superficialmente com polietileno glicol (PEG) ou dextranas, para dificultar seu reconhecimento pelo sistema retículo-endotelial e aumentar seu tempo de circulação sanguínea (Immordino et al., 2006), bem como podem ser conjugados com anticorpos, para se tornarem tecido-específicos (Mishra, *et al.*, 2010; Bochet & Fattal, 2012).

Como os lipídios constituintes de membranas biológicas são zwitteriônicos ou aniônicos (Yeagle, 2011), lipossomas formados com lipídios naturais não apresentam capacidade intrínseca de interação com o material genético (poliânions fosfato); tal que o uso de lipossomas como carreadores de genes somente tornou-se efetivo com a utilização de fosfolipídios catiônicos sintéticos, como o DOTAP (Felgner *et al.*, 1987).

Entretanto, a toxicidade dos solventes orgânicos utilizados na sua formação, a dificuldade de escalonamento industrial (variações entre lotes), a limitada eficiência de carregamento e a baixa estabilidade física na estocagem dos lipossomas são suas principais desvantagens (Sahoo & Labhasetwar, 2003; Gasco, 2007; Mishra *et al.*, 2010). Para tentar contornar as limitações dos lipossomas, outro sistema carreador lipídico foi desenvolvido no início da década de 90, as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000; Gasco, 2007).

#### **1.3.2.2.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)**

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) foram descritas na década de 90 como uma alternativa aos lipossomas, por possuírem uma maior estabilidade física, por até 3 anos em estoque (Gasco, 2007), decorrente de seu núcleo - formado de lipídeos sólidos à temperatura ambiente e corporal. São passíveis de esterilização por autoclave sem a perda da estrutura, além de evitar o uso de solventes orgânicos para solubilizar lipídios, como na Figura 2 (Müller *et al.*, 2000; Mehnert & Mäder, 2001; Charcosset *et al.*, 2005; Gasco, 2007).

Outras vantagens das NLS, comparativamente a outros sistemas, estão relacionadas com sua capacidade de proteger fármacos e ácidos nucleicos da degradação química; melhor biocompatibilidade e baixo custo de escalonamento (Müller *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011). NLS têm atraído atenção para o carregamento de pequenas moléculas, proteínas recombinantes e também para *gene delivery* (tanto de plasmídeos, como de RNA de interferência) através do uso de lipídeos catiônicos em sua formulação. Nessas formulações, estabelecem-se interações eletrostáticas entre os grupos fosfato em ligações fosfodiéster dos ácidos

nucleicos (carga negativa) e a carga positiva naqueles lipídeos, possibilitando, assim, o carregamento do material genético (Müller *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2007).

Um fenômeno indesejável que se observa com as NLS é que, durante o estoque, pode ocorrer uma transição polimórfica (rearranjo no núcleo cristalino da forma  $\alpha$  para forma  $\beta$ ), tal que os lipídios adquirem um arranjo mais rígido, estável e ordenado expulsando, assim, moléculas incorporadas na matriz lipídica sólida (*burst effect*), como mostra a Figura 3. Para evitar esta expulsão indesejada de fármacos incorporados, foram desenvolvidos os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (Gasco, 2007).

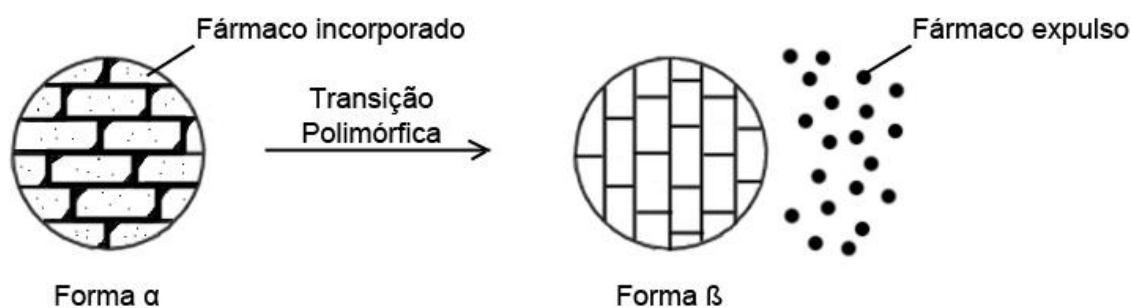


Figura 3 - Transição polimórfica observada em NLS ocasionando a expulsão de moléculas ativas incorporadas na matriz lipídica (*Burst effect*)

#### 1.3.2.2.2. Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) são considerados como a segunda geração de nanopartículas lipídicas (aprimoramento das NLS) em que a utilização de misturas de lipídios sólidos e líquidos (óleos) à temperatura ambiente e/ou corporal para compor o núcleo, como mostra a Figura 2, o que evita a reorganização cristalina observada nas NLS. Com isto, é possível aumentar o tempo de armazenamento e obter um perfil de liberação sustentada mais próximo ao desejado, maior porcentagem de encapsulação de ativos, além das vantagens já presentes nas NLS (Mehnert & Mäder, 2001; Müller *et al.*, 2002; Gasco, 2007).

Essas partículas lipídicas podem ser fabricadas por diversos métodos de preparação.

#### **1.4. Métodos de preparação**

Lipossomas, NLS e CLN podem ser obtidos por diferentes métodos, dentre os quais, dois se tornaram os mais utilizados na literatura: a homogeneização à alta pressão e a microemulsão à quente formada de óleo em água (Gasco, 2007; Silva *et al.*, 2011).

##### **1.4.1. Homogeneização à alta pressão**

Homogeneização à alta pressão foi o método inicial utilizado por Müller e col. (1995) para a produção de NLS, assim como, posteriormente, para preparar CLN. Este método tem demonstrado, até hoje, ser de alto desempenho para produção dessas nanopartículas, sendo o mais amplamente utilizado em literatura (Gasco, 2007). Esta técnica utiliza alta pressão (entre 100-2000 bar) através de um poro de tamanho conhecido para acelerar partículas, de forma que o cisalhamento leva a obtenção de partículas de escala nanométrica (Charcosset *et al.*, 2005). No entanto, a alta pressão e velocidade envolvidas neste método podem limitar o uso de fármacos quimicamente instáveis. Além disso, homogeneizadores pressurizados de escala laboratorial necessitam de pelo menos 50 mL de suspensão para o processo ocorrer, com perda de cerca de 20 mL durante o processo, o que resulta em custo excessivo de produção para o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para aplicações contendo constituintes de alto custo (fármacos, lipídios catiônicos, moléculas marcadas, entre outras). De fato, como descrito anteriormente, a produção de nanopartículas lipídicas (CLN e NLS) para terapia gênica requer a utilização de lipídios catiônicos; tais lipídios sintéticos elevam substancialmente o custo de produção de tais partículas. A perda significativa de material e consequente aumento dos custos de produção durante o processo de homogeneização sob pressão para produção de nanopartículas lipídicas levou ao desenvolvimento de outro método: a microemulsão à quente (Rameez *et al.*, 2009).

### **1.4.2. Microemulsão à quente**

Os menores custos de produção e a possibilidade da incorporação de compostos lábeis ou instáveis à alta pressão exercida pela homogeneização a alta pressão, tornaram a microemulsão à quente uma alternativa (Silva *et al.*, 2011). O método é baseado em 2 passos: - aquecimento e mistura do lipídio liquefeito em água, surfatante e co-surfatante, sob agitação vigorosa (Ultra-turrax); - agitação mecânica da suspensão em um banho frio, solidificando assim a fase lipídica, antes liquefeita, produzindo as partículas desejadas (Souza *et al.*, 2011). Entretanto, este processo necessita de grandes quantidades de surfatante e de co-surfatante para produzir resultados semelhantes aos obtidos com a homogeneização à alta pressão.

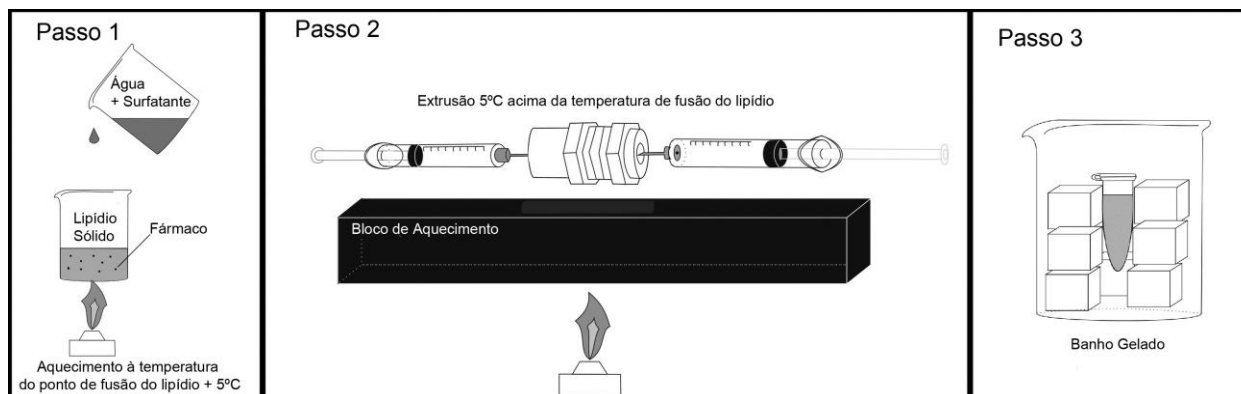
Mesmo utilizando menores volumes que os necessários para homogeneização à alta pressão, a microemulsão à quente ainda requer volumes que podem ser considerados altos para a otimização de formulações contendo componentes de alto custo. Por isso, nós desenvolvemos um método alternativo: adequado para preparo de pequenos volumes (0,25 a 1 mL) e que se baseia na utilização de uma mini-extrusora, para servir de alternativa aos processos atuais de nanopartículas lipídicas. Este novo método, extrusão de microemulsão, apresenta menor custo, uma vez que a mini-extrusora é significativamente mais barata que um agitador tipo *ultra-turrax* e um homogeneizador de alta pressão e não apresenta limitações características desses outros métodos, como a agitação vigorosa criada pelo *ultra-turrax*, ou a alta pressão necessária ao processo homogeneização à alta pressão (Rameez *et al.*, 2009).

#### **1.4.2.1. Extrusão de Microemulsão**

Desenvolvemos, em nosso grupo, uma alternativa para a produção da microemulsão à quente, em pequena escala: a extrusão de microemulsão. Esse sistema é uma variação da microemulsão à quente e é simples, barato, rápido, auto-limpante (pois a amostra passa de um lado para o outro do sistema extrusor, o que diminui a chance de bloqueio da membrana).

Na escala de laboratório, a extrusão de microemulsão serve para extrusão manual, empregando seringas de volume de 0,25 mL ou 1 mL, não requerendo gás sob

pressão, diminuindo os custos de produção. Neste sistema, o lipídio sólido é aquecido 5 °C acima do seu ponto de fusão. Nesta temperatura, o fármaco pode ser adicionado à matriz lipídica e, após homogeneização, é adicionada uma solução contendo o surfatante. Após agitação, seguem-se os ciclos de extrusão e, por fim, o resfriamento em banho gelado, como esquematizado na Figura 4.



*Figura 4- Produção de nanopartículas lipídicas por extrusão de microemulsão*

Este método de produção de nanopartículas oferece uma alternativa eficiente para a homogeneização à alta pressão, necessitando de menores volumes de produção, diminuindo a perda durante o processo e reduzindo os custos de desenvolvimento em escala laboratorial, além de possibilitar vasta gama de possíveis aplicações. Na Tabela 2, comparamos o custo de produção entre a homogeneização de alta pressão e a extrusão de microemulsão.

*Tabela 2 - Relação de preços (em dólares americanos, US\$) para produção das CLN e NLS desenvolvidas nesta dissertação, por homogeneização a alta pressão (20mL) e extrusão de microemulsão (0,2mL), com os valores obtidos comparando-se os volumes mínimos após um ciclo completo de produção. Cotação realizada no dia 20 de março de 2012, em consulta aos sites das empresas Avanti Polar Lipids (Alabaster, EUA) e Sigma-Aldrich (EUA).*

<b>Custo de Fabricação</b>	<b>CLN</b>	<b>NLS</b>
<b>Homogeneização à alta pressão</b>	US\$ 16,56 / produção	US\$ 107,40 / produção
<b>Extrusão de microemulsão</b>	US\$ 0,17 / produção	US\$ 1,07 / produção

Outro aspecto importante a se considerar em sistemas carreadores é a necessidade de esterilização. O método de esterilização é um passo importante para a estabilidade de nanopartículas como NLS e CLN, já que a esterilização por calor/pressão (através de autoclave) pode induzir modificações que comprometeriam sua estabilidade físico-química (Torchilin, 2006). Neste contexto, destacamos a esterilização por microfiltração, no qual consiste em filtrar partículas superiores a 0,3  $\mu\text{m}$  através de membranas com poros definidos a 0,22  $\mu\text{m}$  (Tchobanoglous *et al.*, 2005). Portanto, já que as nanopartículas lipídicas são produzidas em filtros de poros definidos inferiores a 0,22  $\mu\text{m}$ , esta suspensão já se apresenta estéril, sem a necessidade de outros processos anexos, diminuindo ainda mais os custos de produção, demonstrando outra vantagem do processo de extrusão de microemulsão.

Em uma rápida pesquisa de patentes, realizada em 17 de abril de 2012, não encontramos patentes específicas, referentes à extrusão de microemulsões à quente. Assim, de nosso conhecimento, o processo de extrusão de microemulsão é inédito e, portanto, ainda pode requerer certa otimização.



## 2. Objetivos Principais

Portanto, os objetivos desta dissertação foram:

- 1) o desenvolvimento e otimização do método de extrusão de microemulsão;
- 2) a caracterização das nanopartículas lipídicas e comparação com lipossomas;
- 3) a avaliação a capacidade das nanopartículas lipídicas no carreamento de fármacos (*drug delivery*);
- 4) avaliação da capacidade das nanopartículas lipídicas no carreamento de genes (*gene delivery*) e
- 5) avaliação dos efeitos citotóxicos do carreamento conjunto de fármacos (mitoxantrona) e genes (gene para PTEN).

### 2.1. Objetivos específicos

Para atingirmos tais metas, elegemos:

- 1) produzir nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e lipossomas através da extrusão de micromemulsão e otimizar as condições de produção (número de passagens e temperatura do sistema);
- 2) avaliar estabilidade físico-química de estocagem à 4°C e frente à liofilização, juntamente com análise da morfologia utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e analisar o perfil calorimétrico das formulações utilizando a calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- 3) avaliar a encapsulação do fármaco mitoxantrona nos carreadores lipídicos assim como sua cinética de liberação;
- 4) avaliar a capacidade ligação das formulações ao DNAp utilizando o ensaio de retardamento eletroforético (EMSA) e avaliar a proteção do DNAp nas formulações contra a ação da DNase I;
- 5) avaliar o efeito citotóxico das formulações através do ensaio de MTT em uma linhagem não cancerígena (Balb/3T3), em duas linhagens cancerígenas: carcinoma de próstata (PC3) e de mama (MCF-7), esta última resistente ao tratamento com o fármaco mitoxantrona.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Preparação dos Lipossomas de EPC, CLN, Lipossomas de DOTAP e NLS e lipoplexos

Nesta dissertação, vamos manter a nomenclatura das NLS para descrever as partículas contendo somente ácido esteárico no núcleo sólido e de CLN para partículas contendo a mistura de fosfatidilcolina de ovo (EPC) (Sigma-Aldrich, EUA) e o monoestearato de glicerila (Croda, Brasil) como lipídio para o núcleo, cujo ponto de fusão é  $T_c = 54 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ . A formulação de NLS foi inicialmente preparada como base na tese de doutorado de Jesus (2009) e otimizada por nosso grupo, cuja formulação final utilizou ácido esteárico (Sigma-Aldrich, EUA), 1,2-dioleoil 3-trimetilamônio propano (DOTAP) (Avanti polar Lipids, EUA), e Pluronic F68 (Sigma-Aldrich, EUA) nas concentrações descritas na Tabela 3.

*Tabela 3 – Composição das formulações desenvolvidas à partir de ácido esteárico, DOTAP, Pluronic F68, Monoestearato de Glicerila e Fosfatidilcolina de ovo (EPC).*

	Ácido Esteárico (mmol.L <sup>-1</sup> )	DOTAP (mmol.L <sup>-1</sup> )	Pluronic F68 (mmol.L <sup>-1</sup> )	Monoestearato de glicerila (mmol.L <sup>-1</sup> )	Fofastidilcolina de ovo (EPC) (mmol.L <sup>-1</sup> )
<b>Lipossoma</b>					
<b>EPC</b>	-	-	-	-	5,0
<b>CLN</b>	-	-	1,0	5,0	5,0
<b>Lipossoma</b>					
<b>DOTAP</b>	-	2,5	-	-	-
<b>NLS</b>	7,0	2,5	1,0	-	-

As NLS contendo DOTAP se destacaram como promissoras para gene delivery, sendo capazes de proteger e carrear plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His-Topo contendo o gene para proteína PTEN, e entregá-lo para células PC3 (de Jesus, 2009). Estas NLS foram preparadas através da técnica de extrusão de microemulsão em banho quente,

que consiste em misturar os componentes e aquecer o sistema 5 °C acima da temperatura de transição de fases do lipídio que forma o cerne da nanopartículas (neste caso o ácido esteárico, cuja  $T_c = 65 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$ ) (de Jesus, 2009), como explicitado no item 1.4.2.1. Esta microemulsão foi extrudada com uma mini-extrusora de duas seringas (Avanti Polar Lipids, EUA) utilizando membrana policarbonato Isopore<sup>tm</sup> de poro definido (100 nm) (Millipore, Reino Unido). Foi padronizado previamente que, para uma completa homogeneização da amostra, são necessárias 15 passagens da amostra pela membrana de poro definido (de Jesus, 2009). Após as passagens, resfriamos as amostras em gelo (0 °C) e as mesmas foram estocadas a 4°C, como explicitado no Item 1.4.2.1. Ao final do processo foi obtido 1 mL de cada formulação.

Como forma de comparação com este sistema, preparamos uma formulação de CLN, cujos componentes foram monoestearato de glicerila (Croda, Brasil), fosfatidilcolina de ovo (Sigma-Aldrich, EUA) e Pluronic F68 (também denominado Poloxamer 188) (Sigma-Aldrich, EUA), nas concentrações dispostas na Tabela 3. Esta formulação teve por finalidade testar a estabilidade física das nanopartículas lipídicas, cujo potencial Zeta é neutro e compará-la, físico-quimicamente, com a formulação contendo lipídio catiônico (DOTAP), denominada aqui de NLS, em especial em relação à sua estabilidade de estoque e seu comportamento frente à Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), assim como a influência do potencial Zeta sobre estes parâmetros.

Uma suspensão preparada com esses componentes foi submetida à extrusão à quente em membranas de policarbonato Isopore<sup>tm</sup> (Millipore, Reino Unido), com poros de tamanho de 100 nm, através de uma mini-extrusora de duas seringas (Avanti Polar Lipids, Alabaster, EUA), de igual modo às NLS.

Como comparação, foram produzidos lipossomas compostos de EPC ou DOTAP (com as mesmas concentrações destes componentes nas CLN e NLS, como mostrado na Tabela 3). Os lipídios foram solubilizados em clorofórmio (Synth, Brasil), formando uma solução estoque de 50 mmol.L<sup>-1</sup>. Deste estoque, alíquotas correspondentes às concentrações lipossômicas preparadas foram adicionadas aos tubos de ensaio. Evaporou-se o clorofórmio sob fluxo de nitrogênio e os tubos foram mantidos sob vácuo por 2 horas para eliminação do clorofórmio residual, formando-se filmes lipídicos.

Foram adicionados 1 mL de água e, sob agitação, estes filmes foram suspensos. A suspensão lipossomal passou então pela extrusão, da mesma forma que as CLN e NLS, mas em temperatura ambiente.

Para a formação de lipoplexos, misturaram-se os plasmídeos com as CLN ou NLS, na proporção de 3  $\mu$ L de carreador para 2  $\mu$ g de plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His-Topo (Invitrogen, EUA) contendo o gene para proteína PTEN (DNAP) e deixou-se por 20 min. para que pudessem interagir. Esta relação foi determinada para que houvesse equivalência de cargas entre o carreador e o plasmídeo. A Figura 5 mostra a fórmula estrutural dos componentes das CLN, NLS e os lipossomas: DOTAP, ácido esteárico, Pluronic F68, monoesterato de glicerila e fosfatidilcolina de ovo.

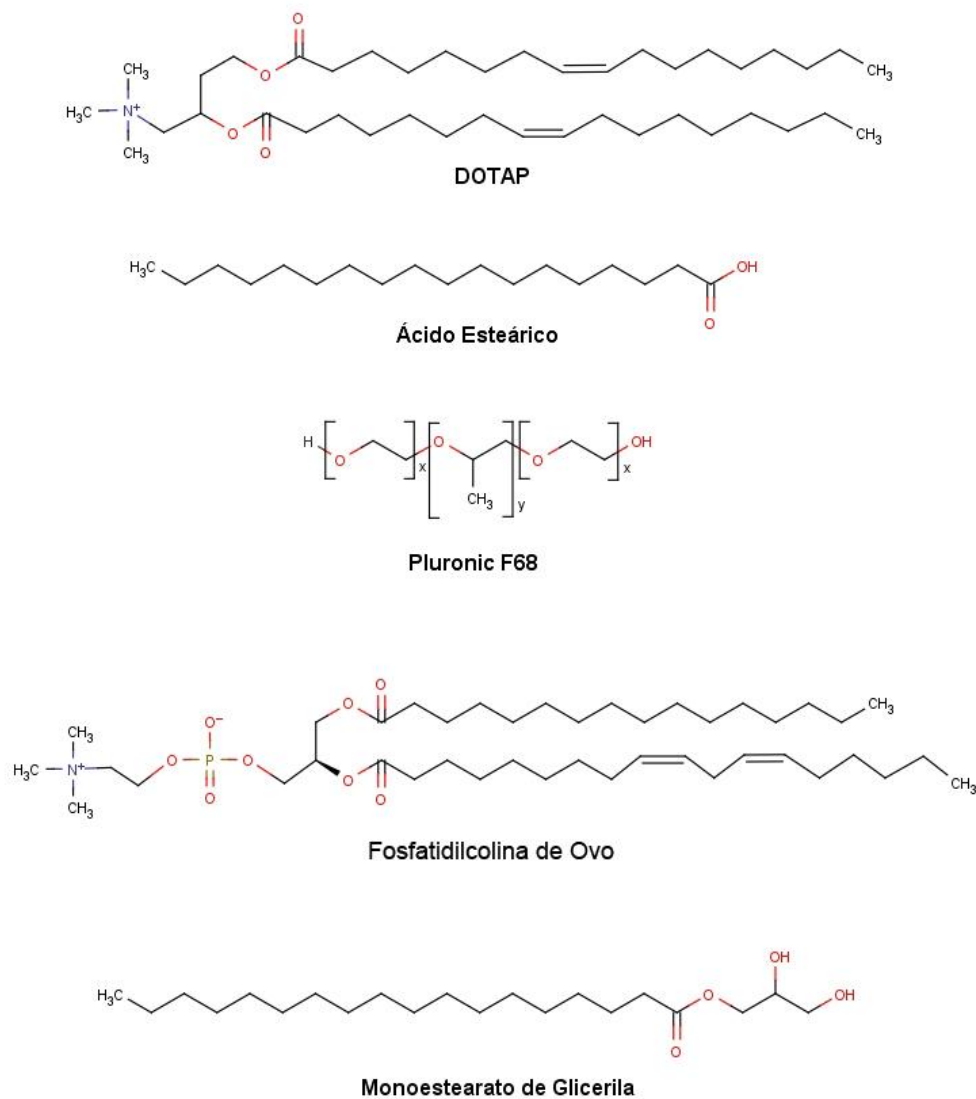


Figura 5 - Estrutura dos compostos utilizados na produção dos lipossomas, CLN e NLS. De cima para baixo. 1,2 -dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP); ácido esteárico; Pluronic F68 (onde  $x$  representa 78 unidades do monômero hidrofílico e  $y$  representa 30 unidades do monômero hidrofóbico); fosfatidilcolina de ovo\*; monoestearato de glicerila.

\* a composição da cadeia acila da EPC é variável em termos de tamanho e saturação, sendo que a representação escolhida (com ácido palmítico em sn-1 e ácido linoleico em sn-2) é a mais frequente, correspondendo a 59,7% das cadeias acila de EPC, de acordo com Grobas et al., 2002).

### 3.2. Otimização da Extrusão de Microemulsão

Com o intuito de otimizar o processo de extrusão para CLN e NLS, variamos o número de passagens (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30) pela membrana de policarbonato de poro definido (100 nm), com a finalidade de determinar o número mínimo de passagens necessário para formação das partículas estáveis, com parâmetros iguais aos obtidos com 30 passagens, verificando, assim, a influência do número de passagens sobre parâmetros físico-químicos como diâmetro médio, polidispersão (PDI) e potencial Zeta, analisadas em um Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido).

De maneira similar, analisamos a variação dos parâmetros físico-químicos das CLN e NLS modificando apenas a temperatura do sistema em +5, +10 e +15 graus acima do ponto de fusão do lipídio sólido (as temperaturas de fusão acrescidas de 5; 10 e 15°C serão representadas a partir deste momento por  $T_f+5$  °C;  $T_f+10$  °C e  $T_f+15$  °C. Para CLN ( $T_{f_{\text{monoestearato de glicerila}}} = 58$  °C) as temperaturas correspondem a 63 °C; 68 °C e 73 °C. E para NLS ( $T_{f_{\text{ácido esteárico}}} = 70$  °C) essas temperaturas correspondem a 75; 80 e 85 °C. Entretanto, para lipossomas de EPC ( $T_{f_{\text{EPC}}} = -15$  °C) e lipossomas de DOTAP ( $T_{f_{\text{DOTAP}}} = -11,9$  °C), o método de extrusão foi realizado à temperatura ambiente, devido aos lipídios já se apresentarem na forma líquida à temperatura ambiente. Para fins de comparação, variando a temperatura de produção do sistema de extrusão, consideramos a temperatura ambiente de 25 °C como a já acrescida dos 5°C necessários para extrusão ( $T_f+5$  °C), portanto, para ambos lipossomas consideramos  $T_f+5$  °C = 25 °C;  $T_f+10$  °C = 30 °C e  $T_f+15$  °C = 35 °C. Após o equilíbrio térmico, os lipossomas foram extrudados, seguindo-se o protocolo disposto para as nanopartículas lipídicas (descrito no item 3.1). Exemplificamos melhor estas temperaturas na Tabela 4. Cada suspensão resultante foi analisada em relação ao diâmetro médio, potencial Zeta e polidispersividade (PDI) em um Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido).

*Tabela 4 – Temperaturas do sistema de microemulsão testadas na otimização da fabricação de nanopartículas lipídicas e lipossomas, designadas por Tf+5°C; Tf+10°C e Tf+15°C.*

<b>Partícula</b>	<b>Tf+5 °C</b>	<b>Tf+10 °C</b>	<b>Tf+15 °C</b>
<b>Lip. EPC</b>	25 °C	30 °C	35 °C
<b>CLN</b>	63 °C	68 °C	73 °C
<b>Lip. DOTAP</b>	25 °C	30 °C	35 °C
<b>NLS</b>	75 °C	80 °C	85 °C

### **3.3. Estabilidade Físico-Química das Formulações Produzidas**

Lipossomas de EPC, CLN, Lipossomas de DOTAP e NLS foram produzidos e, logo após, estocados em eppendorfs a 4 °C, em água Mili-Q<sup>tm</sup>, umidade relativa ambiente e sem cobertura de luminosidade para avaliação da sua estabilidade físico-química ao longo do tempo (0; 7; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 150 e 180 dias), através da medida de parâmetros físico-químicos como tamanho, potencial Zeta e polidispersividade (PDI) em um Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido).

### **3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para análise morfológica de lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS produzidas, foram utilizados *grids* de cobre FCF200-cu (Koch Electron Microscopy, Brasil) para microscopia eletrônica, adicionando-se 1 gota da amostra; e após 10 s secou-se o excesso com papel filtro. Adicionou-se 1 gota do corante negativo (Uranila 2 %, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto, Depto. Engenharia Ambiental / UNESP) por 8 s sobre a superfície do *grid*, secando-o novamente. Em seguida, uma gota de água Mili-Q<sup>tm</sup> foi adicionada à superfície por 5 s, para retirada do excesso de corante. Nanopartículas lipídicas e as formulações lipossomais foram visualizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), utilizando-se o equipamento LEO906E (Zeiss, Alemanha) à 60 kV e aumento de 130.000 vezes.

### **3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Amostras das CLN e NLS e seus componentes, sem os princípios ativos, foram extrudados com 15 passagens e Tf+5 °C e, então, analisadas em um microcalorímetro de varredura VP-DSC (Microcal, Nova Jersey, EUA), utilizando-se a faixa de análise de 10 a 90 °C, com incremento de 60 °C/hora.

### **3.6. Ensaio de Liofilização**

Alíquotas (75 µL de amostra diluídas em 1,425 mL de água Mili-Q) de lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS vazios produzidos foram liofilizadas em presença ou ausência de crioprotetores (trealose ou sacarose) (Sigma-Aldrich, EUA) à concentração final de 4 % (peso:volume). As dispersões resultantes foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas em equipamento liofilizador Freezone 4.5 (Labconco, EUA) por 48 horas. As amostras liofilizadas foram reidratadas com água Mili-Q até o volume inicial (1,5 mL) e suas propriedades físico-químicas resultantes (tamanho, potencial Zeta e PDI) foram analisadas em equipamento Zetasizer (Malvern, Reino Unido) e comparadas com a de alíquotas não liofilizadas.

### **3.7. Ensaios de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)**

Para o Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA), 2 µg de plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His-Topo (Invitrogen, EUA) contendo o gene para proteína PTEN (DNAP) foi diluído em 10 µl de água Milli-Q™, enquanto que 3 µl de nanopartículas (lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP ou NLS) vazias foram diluídos em outros 7 µl de água Milli-Q™. Após misturadas, as amostras foram incubadas por 20 min.; em seguida foram aplicadas em um gel de agarose a 1,3 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submetidas à eletroforese, sob tensão de 50 V, por 2 h. Foi utilizado como controle nesse ensaio, uma amostra contendo somente 2 µg DNAP livre. Uma solução de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) a 10 % foi usada nas corridas para evitar possíveis interferências do azul de bromofenol, presente no tampão de corrida convencional, na interação DNAP:nanopartícula. A análise foi realizada em câmara sob luz UV (cedida, gentilmente, pelo Prof. Dr. Marcelo



Lancellotti, do Depto. de Bioquímica / IB / UNICAMP), onde os resultados foram visualizados e fotografados. As bandas foram quantificadas utilizando-se o software ImageJ (Abramoff et al, 2004; Rasband, 2012; Scheider et al, 2012).

### **3.8. Ensaio de Proteção contra DNase I**

Para o ensaio de proteção do material genético contra DNase I, 2 µg de plasmídeo pcDNA 3.1/V5-His-Topo (Invitrogen, EUA) contendo o gene para proteína PTEN (DNAP) foi diluído em 10 µl de água Milli-Q™, enquanto que 3 µl de nanopartículas (lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP ou NLS) foram diluídas em outros 7 µl de água Milli-Q™. Depois de misturadas, as amostras foram incubadas por 20 min.; em seguida foi aplicado 1 U de DNase I (Invitrogen, EUA) para cada 2,5 µg de DNAP e, em seguida as amostras foram incubadas, novamente, à 37°C por 30 min. Após esta etapa, foi adicionado 1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich, EUA), volume final, para dissociação do DNAP dos carreadores, e então foram aplicadas em um gel de agarose a 1,3 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e submetidas à eletroforese, sob tensão de 50 V, por 2 h. Foram utilizados dois controles nesse ensaio, um deles contendo somente DNAP (2 µg) e outro contendo 2 µg DNAP e DNase I. Uma solução de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) a 10 % foi usada durante as corridas para evitar possíveis interferências do azul de bromofenol, presente no tampão de corrida convencional, na interação DNAP:nanopartícula. A análise foi realizada em câmara sob luz UV (cedida, gentilmente, pelo Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, do Depto. de Bioquímica / IB / UNICAMP), onde os resultados foram visualizados e fotografados. As bandas foram quantificadas utilizando o software ImageJ (Abramoff et al, 2004; Rasband, 2012; Scheider et al, 2012).

### **3.9. Encapsulação de Mitoxantrona**

Testamos a capacidade das formulações de CLN e NLS em encapsular o fármaco mitoxantrona (MTX) (Sigma-Aldrich, EUA). Para isto, produzimos as partículas tais como descrito no item 3.1, com a adição de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de MTX (concentração final)

na fase lipídica. Após a produção, avaliamos as partículas em termos de diâmetro médio, potencial Zeta e polidispersão, em um Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido).

Avaliamos, também, a porcentagem de encapsulação de MTX pelas nanopartículas. Para tanto, adicionamos 150  $\mu\text{L}$  das partículas produzidas na presença de mitoxantrona e as filtramos através de filtros de 10 kDa (Millex, Millipore) sob centrifugação a 3550 x  $g$ , por 5 min. Em seguida, o filtrado foi coletado e, ao filtro, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de solução de SDS (Sigma-Aldrich, EUA) a 20 %, para rompimento das partículas, que foram centrifugadas novamente à 3550 x  $g$ , por 5 min. O novo filtrado foi analisado em espectrofotômetro Carywin 50 (Varian, EUA), em 672 nm, e a absorbância medida permitiu a quantificação da mitoxantrona encapsulada nos carreadores, pelo uso da curva padrão de mitoxantrona, exposta na Figura 6.

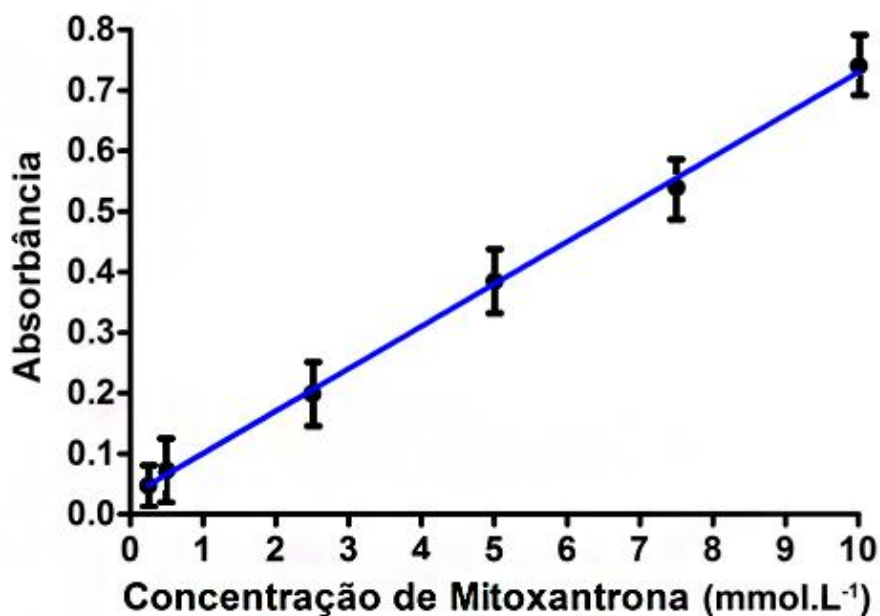


Figura 6 – Curva padrão de mitoxantrona . Absorbância a 672 nm foi determinada em função da concentração de mitoxantrona (0 a 10 mmol.L<sup>-1</sup>). Média de 3 experimentos independentes (n=3),  $r^2 = 0,9982$  e equação de reta definida por "  $y = 0,0975x + 0,1525$ "

### **3.10. Liberação *in vitro* de mitoxantrona**

Sacos de diálise de 12-14 kDa (Spectrumlab, EUA) foram umedecidos em tampão fosfato salino (PBS) durante pernoite antes de serem abertos e cortados em 2 folhas. Uma folha da membrana de diálise foi adaptada em um sistema de células de Franz separando a câmara doadora da receptora. Foi aplicado na câmara doadora 200  $\mu\text{L}$  das amostras diluídos em 0,8 mL de PBS, contendo 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de Mitoxantrona (Sigma-Aldrich, EUA) livre ou nos carreadores (lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP ou NLS), enquanto que 4 mL de PBS foram adicionados à câmara receptora da célula de Franz, de forma que não houvesse bolhas na interface do líquido com a membrana. 250  $\mu\text{L}$  do volume contido na câmara receptora foram coletados em tempos determinados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48 e 72 h) e analisados em espectrofotômetro Carywin 50 (Varian, EUA), em 672 nm. A absorbância medida permitiu a quantificação da mitoxantrona permeada, pelo uso da curva padrão de mitoxantrona, exposta na Figura 6. O volume retirado da câmara receptora para análise (250  $\mu\text{L}$ ) foi imediatamente repostado com igual volume de PBS.

### **3.11. Cultura de células**

Células de câncer de próstata metastáticas (PC3), câncer de mama (MCF-7) e de fibroblastos de camundongo (Balb/3T3), gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Veríssima Ferreira, Depto. Bioquímica / IB / UNICAMP, foram cultivadas em meio RPMI1640 (Biomol, Brasil) suplementado com 10 % de Soro fetal bovino inativo (Biomol, Brasil), 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  de L-glutamina (Biomol, Brasil), 100 U/mL de penicilina (Biomol, Brasil) e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (Biomol, Brasil). Todas as linhagens foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  em incubadora REVCO Ultima II (Thermo Scientific, França).

#### **3.11.1. Seleção de células MCF-7 resistentes à mitoxantrona**

As células de MCF-7 obtidas foram expostas a 100  $\text{nmol.L}^{-1}$  de MTX (Sigma-Aldrich, EUA), para seleção de células resistentes à fármaco. A cada troca de meio (aproximadamente 3 vezes por semana), 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  de MTX era adicionado ao meio,

para manutenção do genótipo, submetendo-as sob ação do fármaco por, pelo menos, 1 mês antes do experimento, tempo necessário para evitar contaminação com células não resistentes (Volk *et al.*, 2000). Para os experimentos, as células foram mantidas em meio sem fármaco por 1 semana, evitando quaisquer efeitos advindos do meio seletivo e não propriamente da MTX incorporada nas partículas (Taylor *et al.*, 1991; Volk *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

### **3.12. Viabilidade Celular**

Para avaliação da citotoxicidade *in vitro*, utilizou-se o teste de MTT, cujo princípio consiste na captação deste corante e sua redução à formazan (um composto de cor púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto em células viáveis. A lise das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser, então, quantificado em 570 nm (Denizot & Lang, 1986). Células Balb/3T3, PC3 e MCF-7 foram plaqueadas à concentração de  $10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Após o pernoite para adesão, o meio foi trocado e adicionado de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de CLN ou  $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de NLS (concentrações finais), correspondentes a  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em cada (as concentrações encapsuladas foram determinadas anteriormente, conforme item 3.5). Em seguida,  $2,0 \mu\text{g/mL}$  de DNAP foram adicionados na suspensão das partículas para formação de lipoplexos, para CLN, lipossoma de EPC, NLS e lipossoma de DOTAP. Após tratamento por 24 h, o meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo o corante MTT ( $1 \text{ mg/mL}$ ) (Sigma-Aldrich, EUA) e as células foram incubadas por mais 4 h. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e  $0,2 \text{ mL}$  de etanol (Synth, Brasil) foi adicionado por poço, para solubilização do formazan formado. As placas foram agitadas por 10 min. e a absorbância medida a 570 nm em espectrofotômetro ELX800 (Biotek, EUA).

### **3.13. Análise Estatística**

Os resultados apresentados foram analisados pelo software Graphpad Prism (GraphPad Softwares, EUA) com significância de 95% de confiança ( $p < 0,05$ )

O teste de otimização do número de passagens e temperatura do sistema foram reportados com média de 3 experimentos ( $n=3$ ), com respectivos desvio-padrões e comparadas através da análise de variância (ANOVA) com os dados de 30 passagens pela membrana, para otimização do número de passagens, enquanto que os dados de temperatura foram comparados com a temperatura inicial ( $T_f+5$  °C).

Para estabilidade das nanopartículas, os dados são reportados com média de 3 experimentos ( $n=3$ ), com respectivos desvio-padrões e comparadas através da análise de variância (ANOVA) com respectivos os dados iniciais (0 dias) para cada partícula.

Os testes de Liofilização e encapsulação de mitoxantrona são reportados com média de 3 experimentos ( $n=3$ ), com respectivos desvio-padrões e comparadas através da análise de variância (ANOVA) com dados para partículas não liofilizadas e partículas vazias, respectivamente.

Os testes de liberação *in vitro*, EMSA e Proteção contra DNase I são mostrados como média de 2 experimentos independente ( $n=2$ ).

Os resultados dos testes de citotoxicidade foram reportados como médias de 3 experimentos diferentes ( $n=3$ ) com respectivos desvios-padrão e foram analisados através da análise de variância (ANOVA) com pós análise através do Teste de Tukey.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Extrusão de microemulsão para produção de nanopartículas lipídicas**

Nesta dissertação optamos por desenvolver e explorar o método de extrusão de microemulsão para produzir nanopartículas lipídicas, que foram comparadas com formulações lipossomais de composição similar. Uma vez que, desde a primeira publicação por Olson e colaboradores (1979), esse método tem sido largamente aplicado para produção de lipossomas em escala laboratorial. A produção de nanopartículas lipídicas em escala laboratorial é apresentada aqui como uma alternativa à técnica de homogeneização à alta pressão (que requer maior volume de amostra); reduzindo assim, os custos de produção, normalmente associados ao uso de lipídios catiônicos (como visto na Tabela 2). A redução no volume de formulação

preparada traz diversas vantagens para o uso em laboratório, dentre elas podemos destacar o fato de ser um método barato, rápido, reprodutível, livre de solventes orgânicos, passível de ser realizado em pequenos volumes.

Inicialmente, avaliamos a otimização dos principais parâmetros do processo de produção dessas nanopartículas, como intuito de padronizar a extrusão de microemulsão como processo de produção de nanopartículas lipídicas. O primeiro parâmetro avaliado foi o número de passagens necessárias para que as NLS, CLN e lipossomas fossem formados, com as características desejadas. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 5 e melhor visualizados nas Figuras 7 a 9.

*Tabela 5 - Variação do diâmetro médio, potencial Zeta e PDI dos Lipossomas de EPC, CLN, Lipossomas de DOTAP e NLS, todas fabricados a  $T_f+5^\circ\text{C}$ , em relação ao número de passagens pela membrana de 100nm. (\*) – Diferença estatística ( $p<0,05$ ) em relação ao diâmetro médio das partículas após 30 passagens; (\*\*) – Diferença estatística em relação ao potencial Zeta da partícula com 30 passagens; (\*\*\*) – Diferença estatística em relação ao PDI das partículas após 30 passagens pela membrana. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).*

Passagens pela membrana		0	5	10	15	20	25	30
<b>Lip. EPC</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	1823,0 $\pm$ 79,5*	327,2 $\pm$ 39,2*	164,1 $\pm$ 17,9	169,2 $\pm$ 31,2	173,9 $\pm$ 32,7	152,1 $\pm$ 18,4	150,3 $\pm$ 11,5
	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	1,51 $\pm$ 5,43	2,20 $\pm$ 5,59	3,35 $\pm$ 4,34	0,54 $\pm$ 2,79	0,68 $\pm$ 6,23	3,25 $\pm$ 7,35	1,82 $\pm$ 1,65
	<b>PDI</b>	0,999 $\pm$ 0,002***	0,654 $\pm$ 0,024***	0,239 $\pm$ 0,062***	0,195 $\pm$ 0,035	0,192 $\pm$ 0,035	0,142 $\pm$ 0,021	0,165 $\pm$ 0,027
<b>CLN</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	1615,0 $\pm$ 56,7*	182,9 $\pm$ 60,9	141,3 $\pm$ 42,3	111,4 $\pm$ 11,4	113,5 $\pm$ 10,3	118,3 $\pm$ 6,1	119,0 $\pm$ 8,9
	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-21,70 $\pm$ 10,42**	-11,75 $\pm$ 10,35**	-7,55 $\pm$ 10,78**	-2,91 $\pm$ 2,13	-1,91 $\pm$ 2,13	1,41 $\pm$ 2,15	1,39 $\pm$ 2,01
	<b>PDI</b>	1,000 $\pm$ 0,000***	0,689 $\pm$ 0,389 ***	0,143 $\pm$ 0,003	0,143 $\pm$ 0,012	0,137 $\pm$ 0,010	0,139 $\pm$ 0,016	0,139 $\pm$ 0,017
<b>Lip. DOTAP</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	1189,0 $\pm$ 273,8*	233,7 $\pm$ 28,6	147,1 $\pm$ 19,2	152,7 $\pm$ 27,8	152,2 $\pm$ 31,0	155,9 $\pm$ 28,0	184,3 $\pm$ 10,4
	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	67,50 $\pm$ 3,54**	62,50 $\pm$ 3,54**	53,60 $\pm$ 5,09	50,88 $\pm$ 1,59	49,60 $\pm$ 10,36	53,35 $\pm$ 6,29	51,80 $\pm$ 10,56
	<b>PDI</b>	0,999 $\pm$ 0,001***	0,545 $\pm$ 0,074***	0,226 $\pm$ 0,019***	0,172 $\pm$ 0,009	0,180 $\pm$ 0,015	0,163 $\pm$ 0,011	0,167 $\pm$ 0,007
<b>NLS</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	1287,0 $\pm$ 75,2*	455,7 $\pm$ 80,1*	161,9 $\pm$ 15,0	165,9 $\pm$ 15,3	147,7 $\pm$ 24,0	135,0 $\pm$ 21,5	135,9 $\pm$ 11,3
	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	51,57 $\pm$ 8,69	53,07 $\pm$ 11,05	48,44 $\pm$ 5,40	49,78 $\pm$ 7,74	50,08 $\pm$ 6,95	52,48 $\pm$ 3,41	52,84 $\pm$ 4,67
	<b>PDI</b>	1,0 $\pm$ 0,000***	0,689 $\pm$ 0,123***	0,143 $\pm$ 0,003	0,143 $\pm$ 0,012	0,137 $\pm$ 0,010	0,139 $\pm$ 0,016	0,138 $\pm$ 0,016

Em relação ao diâmetro médio, observamos uma diminuição do tamanho médio com aumento do número de passagens, a partir da 10ª passagem (Figura 7) é possível verificar que o tamanho das formulações não varia mais. Apenas formulações que não foram extrudadas (0 passagens) e com 5 passagens (para Lipossoma de EPC e NLS) foram estatisticamente diferentes, em relação ao diâmetro final das partículas obtidas após 30 passagens pela extrusora. Isso indica que para todas as preparações a extrusão diminuiu significativamente o diâmetro médio das partículas.

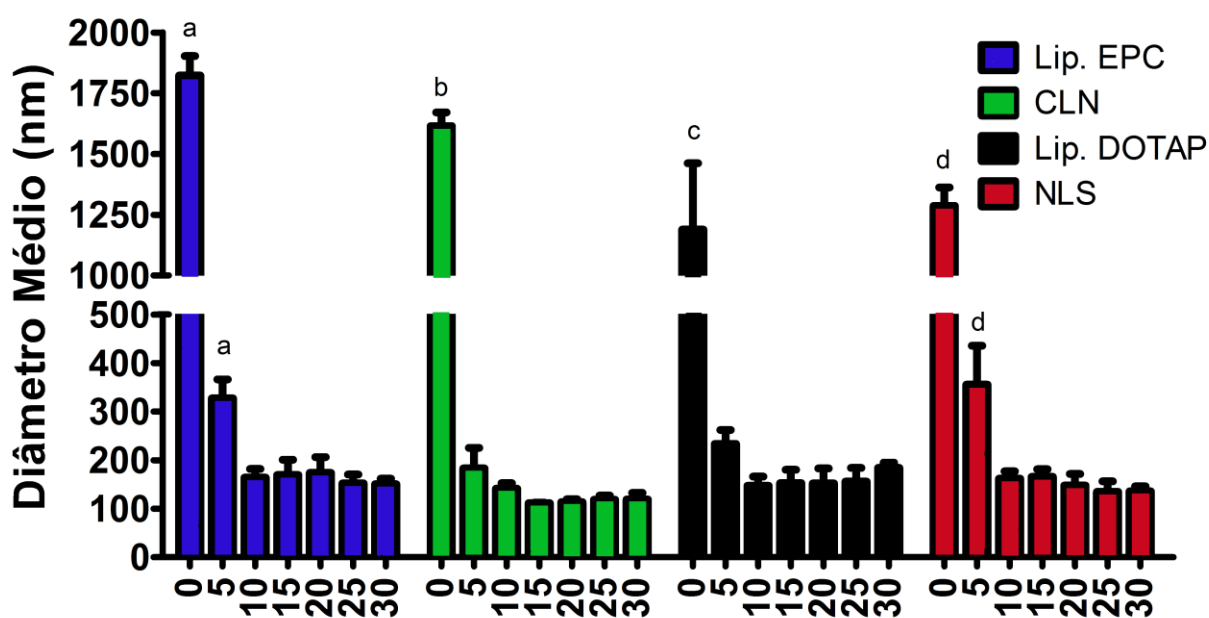


Figura 7 - Variação do diâmetro médio de lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação ao número de passagens pela membrana de extrusão de 100 nm. “a” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no diâmetro médio em relação aos lipossomas de EPC com 30 passagens; “b” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do diâmetro médio em relação à CLN com 30 passagens; “c” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do diâmetro médio em relação aos lipossomas de DOTAP com 30 passagens e “d” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do diâmetro médio em relação a NLS com 30 passagens. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).



O potencial Zeta das formulações de lipossomas de EPC e NLS não variou estatisticamente em função do número de passagens pela extrusora (Figura 8). Entretanto, 0, 5 e 10 passagens de Lipossomas de DOTAP e 0 e 5 passagens para os CLNs apresentaram uma variação para este parâmetro quando comparados com 30 passagens para as mesmas formulações. Para os CLN, é possível que, antes da extrusão, o arranjo molecular favorecesse a exposição dos grupamentos fosfato da EPC na superfície das partículas de CLN, já que esses grupos constituem as únicas cargas aniônicas existentes nestas partículas, explicando assim os valores negativos de potencial Zeta observados a 0, 5 e 10 passagens pela membrana (Figura 8). Além disso, é possível notar a clara diferença entre partículas carregadas (lipossomas de DOTAP e NLS) com potencial zeta altamente positivo ( $> +50$  mV), enquanto que (lipossoma de EPC e CLN) apresentam um potencial zeta próximo a neutralidade após a extrusão.

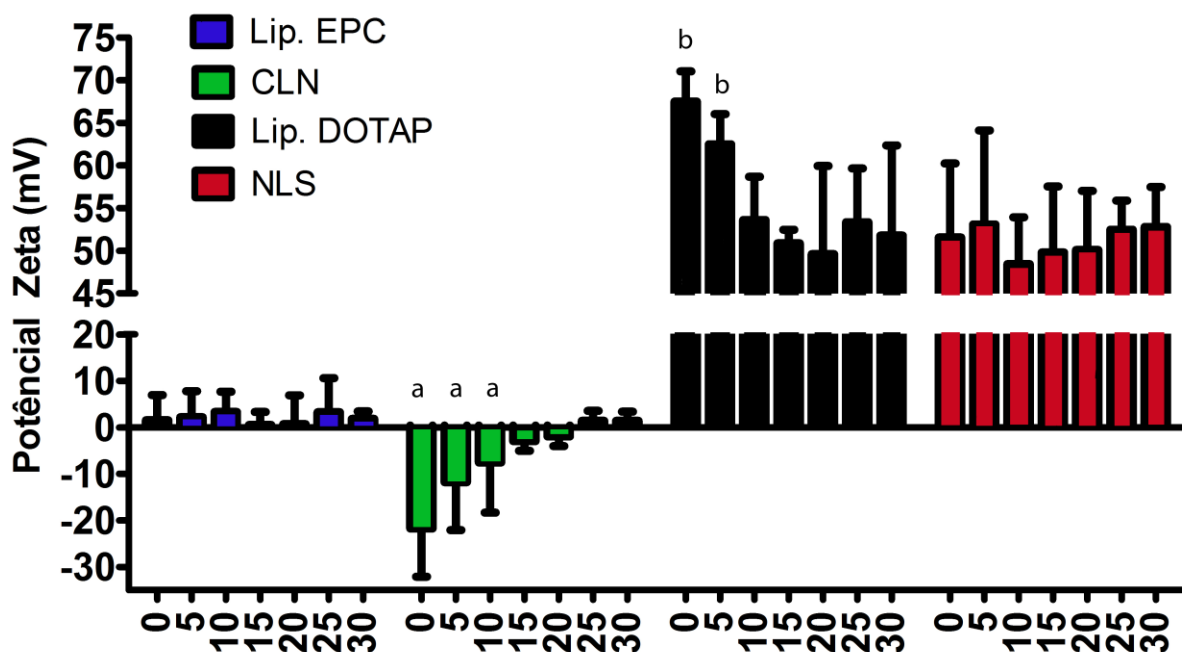


Figura 8 - Variação do Potencial Zeta dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação ao número de passagens pela membrana de 100nm. “a” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do Potencial Zeta em relação ao CLN com 30 passagens e “b” em relação

*aos lipossomas de DOTAP com 30 passagens. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3).*

Foi avaliado ainda, o índice de polidispersividade (PDI), que mede a variação do tamanho da população, um dos pontos cruciais para o sucesso das terapias (entrega de material genético e fármaco). Este índice determina a qualidade da suspensão, segundo a sua heterogeneidade. O índice varia de 0, como suspensão totalmente homogênea, até 1, em suspensão totalmente heterogênea. Relatam-se valores de PDI abaixo 0,250 como ideais para administração intravenosa para suspensões coloidais (Müller & Heinemann, 1992), sendo aceitáveis para suspensões coloidais valores de até 0,300 (Gasco, 2007).

Olson e col. (1979) foram os primeiros a padronizar a produção de formulações lipossomais utilizando o sistema de extrusão e, posteriormente, Morano e col. (1990) solicitaram o pedido de patente. O mesmo grupo utilizou membranas de policarbonato e nylon para minimizar a polidispersão dos lipossomas de EPC e obtiveram partículas com diâmetro médio entre 250-270 nm e PDI ligeiramente acima de 0,2, após 10 passagens pela membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . Mui e col. (2003), utilizando membranas de policarbonato de 0,2  $\mu\text{m}$  obtiveram resultados similares, no preparo de lipossomas constituídos de EPC e colesterol. Em nosso caso (Figura 9), com 10 passagens em membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ , os lipossomas de EPC já apresentaram tamanhos próximos de 160 nm e polidispersão ligeiramente acima de 0,2 (Tabela 5), mostrando que através da extrusão em pequenos volumes (de 1 mL) é possível produzir nanopartículas lipídicas, NLS e CLN, com características físico-químicas semelhantes àquelas encontradas em lipossomas obtidos da mesma maneira.

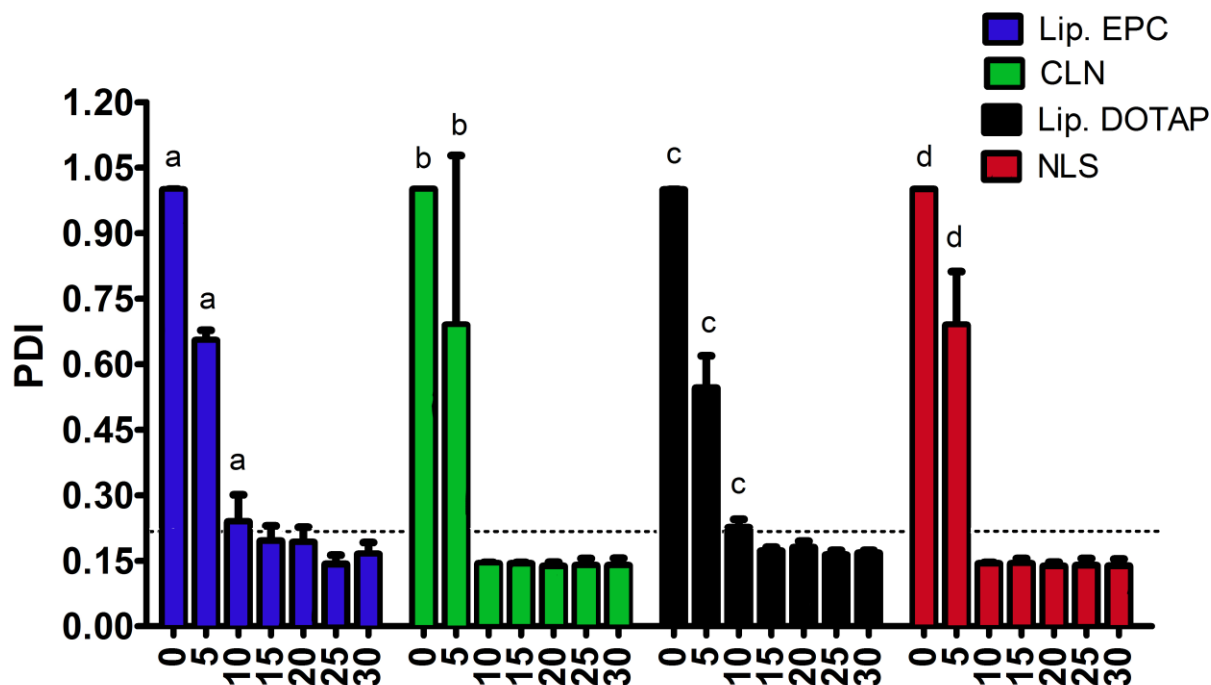


Figura 9 - Variação do PDI dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação ao número de passagens pela membrana de 100 nm. “a” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do PDI em relação aos lipossomas de EPC com 30 passagens; “b” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do PDI em relação ao CLN com 30 passagens; “c” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do PDI em relação aos lipossomas de DOTAP com 30 passagens; “d” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do PDI em relação a NLS com 30 passagens. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ). A Linha representa o limite estabelecido por Müller & Heinemann (1992) para polidispersões coloidais

Os valores de PDI para formulações passíveis de serem administradas através da via intravenosa devem ser menores que 0,250 (Müller & Heinemann, 1992; Müller *et al.*, 1995; Gasco, 2007), para nossas formulações esse valor de polidispersão foi alcançado após 10 passagens pelas membranas de extrusão, para todas as formulações.

Tomados em conjunto, os dados físico-químicos (diâmetro médio, potencial zeta, e PDI) demonstram que para uma produção homogênea de nanopartículas lipídicas são necessárias pelo menos 10 passagens pela membrana de extrusão. Com isso em mente e por precaução, adotamos 15 passagens pela membrana para garantir a

homogeneidade das formulações durante a produção de nanopartículas lipídicas através do método de extrusão.

Em seguida, passamos a avaliar outra variável importante no sistema de produção de nanopartículas lipídicas por extrusão: a influência da temperatura do sistema sobre parâmetros físico-químicos das partículas. Neste experimento avaliamos a influência da temperatura de produção das NLS e CLN, em comparação com lipossomas, como mostram os dados expostos na Tabela 6 e melhor visualizados nas Figuras 10, 11 e 12.

Tabela 6 - Variação do diâmetro médio, potencial Zeta e PDI dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação à variação da temperatura de fusão ( $T_f$ ) dos respectivos lipídios sólidos. (\*) representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o diâmetro médio da partícula em relação a  $T_f + 5^\circ\text{C}$ , enquanto que (\*\*) representa diferença estatística em comparação com PDI da mesma partícula fabricada com  $T_f + 5^\circ\text{C}$ . Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Temp.	$T_f + 5^\circ\text{C}$			$T_f + 10^\circ\text{C}$			$T_f + 15^\circ\text{C}$		
	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
<b>Lip. EPC</b>	119,4 $\pm$ 10,0	1,82 $\pm$ 2,14	0,137 $\pm$ 0,022	137,4 $\pm$ 9,8	1,81 $\pm$ 1,25	0,238 $\pm$ 0,028**	205,0 $\pm$ 18,7*	2,94 $\pm$ 4,75	0,350 $\pm$ 0,047**
<b>CLN</b>	109,8 $\pm$ 10,4	-1,41 $\pm$ 0,23	0,108 $\pm$ 0,004	113,0 $\pm$ 7,4	-1,27 $\pm$ 0,23	0,147 $\pm$ 0,005	132,8 $\pm$ 16,9	-3,380 $\pm$ 4,76	0,156 $\pm$ 0,010
<b>Lip DOTAP</b>	219,6 $\pm$ 7,0	51,48 $\pm$ 3,15	0,154 $\pm$ 0,010	277,9 $\pm$ 10,8*	49,61 $\pm$ 1,15	0,338 $\pm$ 0,018**	305,0 $\pm$ 12,7*	57,90 $\pm$ 4,17	0,559 $\pm$ 0,060**
<b>NLS</b>	166,4 $\pm$ 7,7	50,42 $\pm$ 1,56	0,145 $\pm$ 0,018	153,6 $\pm$ 9,8	49,65 $\pm$ 1,86	0,289 $\pm$ 0,021**	142,0 $\pm$ 10,4*	50,81 $\pm$ 4,09	0,294 $\pm$ 0,027**

É descrito que o aumento da temperatura leva a um aumento no tamanho de lipossomas, devido a mudanças na viscosidade das bicamadas (Zook & Vreeland, 2010). Além disso, a fusão dos lipídios sólidos é um parâmetro importante na produção de nanopartículas lipídicas por outros métodos, justificando que analisássemos o efeito da variação da temperatura de produção, nas características físico-químicas das nanopartículas lipídicas obtidas. Como descrito anteriormente (Material e Métodos, item 3.2), as temperaturas testadas correspondiam a 5, 10 e 15 °C acima da temperatura de fusão ( $T_f$ ) dos lipídios ácido esteárico nas NLS e monoestearato de glicerila nos CLN (cujas temperaturas pode ser visto na Tabela 4). Inicialmente notamos que o aquecimento do sistema aumentou o diâmetro médio dos lipossomas de EPC e de DOTAP, como já descrito em literatura (Zook & Vreeland, 2010), enquanto que para as NLS, houve uma diminuição do diâmetro médio partículas produzidas a  $T_f+15$  °C. Isto pode ser explicado pelo possível rearranjo do ácido esteárico, para uma forma mais compactada com o aquecimento. As Figuras 10, 11 e 12 mostram os dados de diâmetro médio, potencial Zeta e PDI das partículas produzidas variando-se a temperatura do sistema ( $T_f+5$  °C,  $T_f+10$  °C e  $T_f+15$  °C).

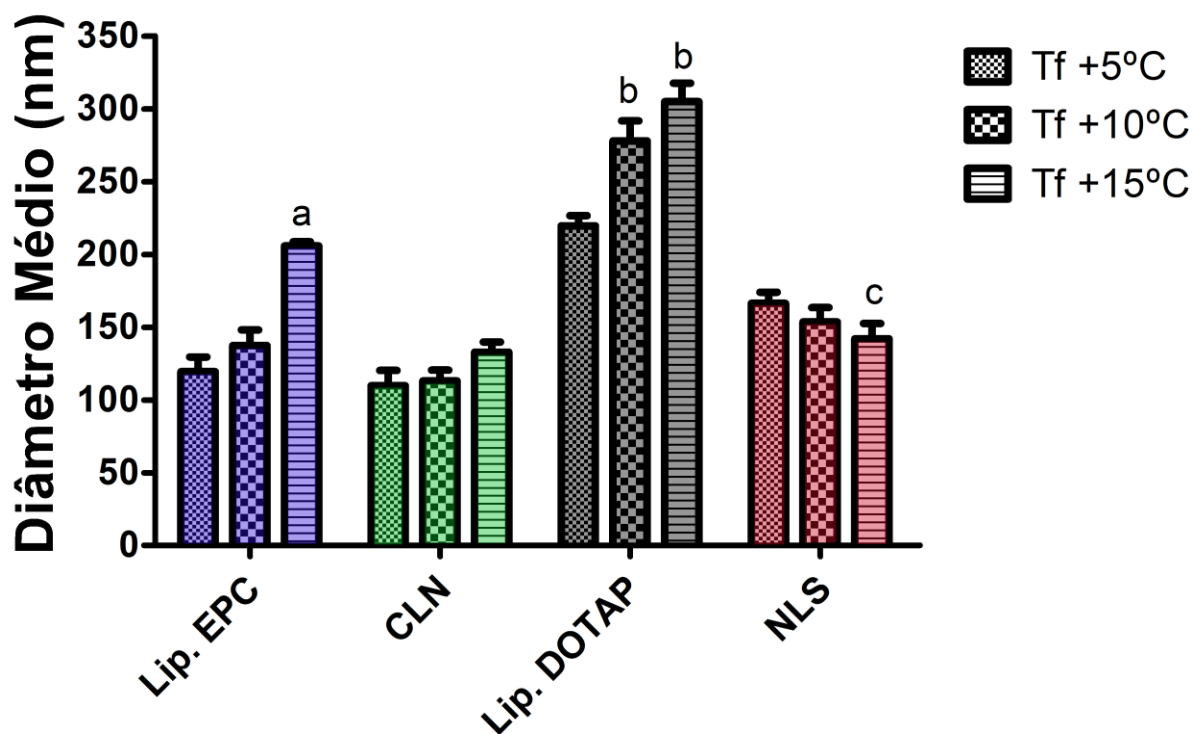


Figura 10 - Diâmetro médio dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação à variação de temperatura do sistema com incrementos de 5 °C acima da temperatura de fusão ( $T_f$ ) dos lipídios sólidos. No qual “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial ( $T_f + 5$  °C) para lipossomas de EPC; “b” e “c” representam a mesma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos pontos iniciais de lipossomas de DOTAP e NLS. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Quanto ao diâmetro médio (Figura 10), as nanopartículas lipídicas (CLN e NLS) não sofreram mudanças significativas, com exceção do CLN produzido com  $T_f + 15$  °C, o qual diminuiu seu diâmetro médio de forma significativa com o aumento da temperatura do sistema. Neste caso, o aumento temperatura do sistema para  $T_f + 15$  °C pode ter auxiliado no cisalhamento dessas partículas, evidenciado pela maior facilidade de passagem desta formulação na  $T_f + 15$  °C.

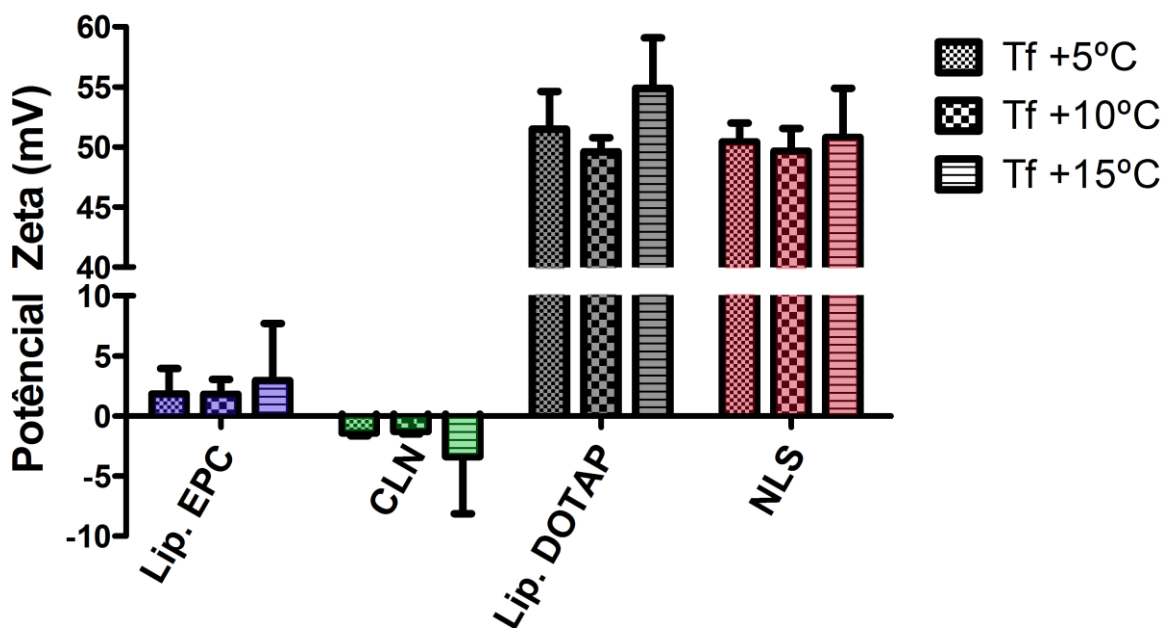


Figura 11 - Potencial Zeta (mV) dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação à variação de temperatura do sistema com incrementos de 5°C acima da temperatura de fusão ( $T_f$ ) dos lipídios sólidos. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Vemos que a variação na temperatura de produção das nanopartículas lipídicas não levou a diferença estatística (Figura 11) do potencial Zeta de qualquer das formulações testadas. Mesmo para a formulação de NLS preparada a  $T_f+5$  °C o potencial de cargas superficiais não foi significativamente diferente das formulações preparadas nas outras temperaturas, a saber,  $T_f+10$  °C e  $T_f+15$  °C.

Já para o PDI (Figura 12), vemos que o perfil de variação se assemelha mais com as encontradas para o diâmetro médio, porém com diferenças mais pronunciadas. Para as formulações lipossomais (EPC e DOTAP) há um aumento progressivo da heterogeneidade da suspensão com o aumento da temperatura, mostrando, a maior fragilidade dos lipossomas em relação à variação temperatura durante o processo de fabricação. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas (CLN e NLS) se mostram, novamente, mais estáveis, em relação à variação de temperatura. Apesar do valor de PDI da NLS apresentar um levemente acima do ideal descrito em literatura (0,250),



mas ainda assim dentro do limite aceitável (até 0,300) para tal suspensão (Gasco, 2007). Enquanto que, os lipossomas de EPC e DOTAP tiveram seus valores de PDI aumentados para além dos limites de suspensões (PDI maiores que 0,300).

Há relatos em literatura mostrando que o aumento da temperatura do sistema provoca um aumento do diâmetro e polidispersão de NLS (Charcosset, El-Harati *et al.*, 2005; Charcosset, El-Harati *et al.*, 2006), o que demonstra a influência de temperaturas demasiadamente altas sobre a estabilidade coloidal das NLS. Em nosso ensaio, observamos isso apenas para as formulações lipossomais - aumento significativo ( $p < 0,05$ ) à  $T_f + 15$  °C - de DOTAP e EPC (Figuras 10 e 12).

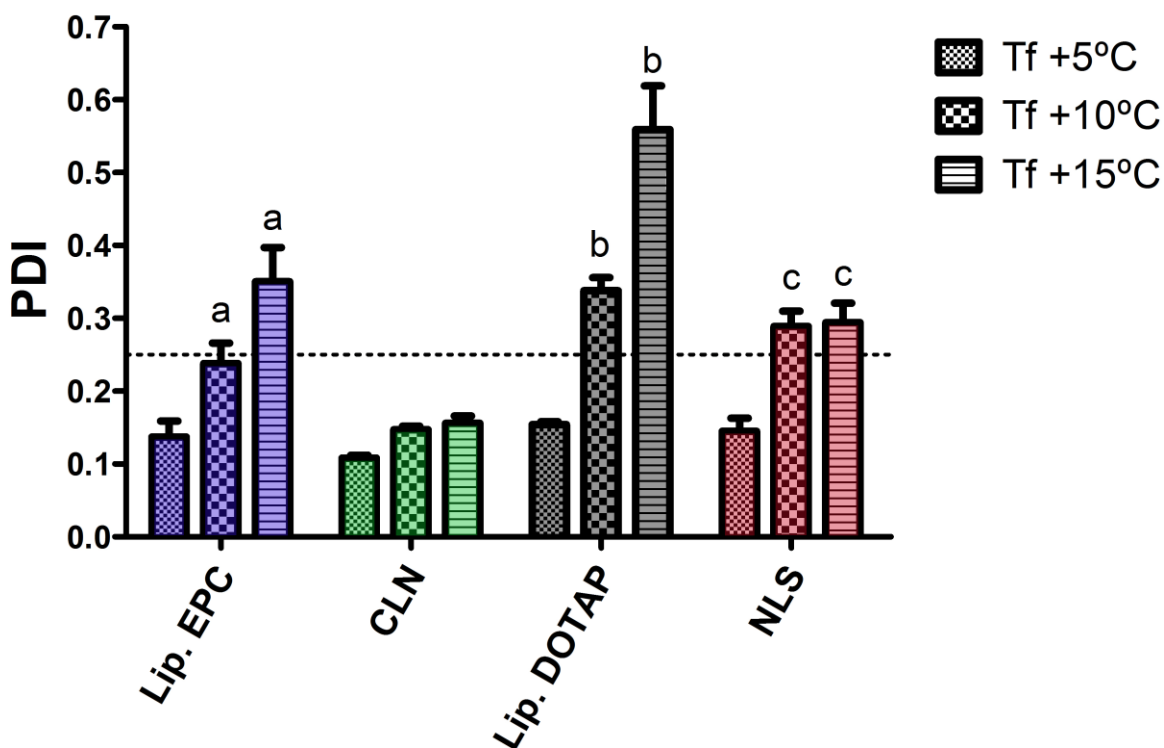


Figura 12 - PDI dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em relação à variação de temperatura do sistema com incrementos de 5 °C acima da temperatura de fusão (Tf) dos lipídios sólidos. No qual “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (Tf+5 °C) para Lipossomas de EPC; “b” e “c” representam a mesma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos pontos iniciais de Lipossomas de DOTAP e NLS. A linha representa o limite estabelecido por Müller & Heinemann (1992) para polidispersões coloidais. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Com isso, podemos concluir que as CLN e NLS preparadas até 15 °C acima da temperatura de transição dos lipídios constituintes do cerne das partículas não sofrem grande influência da temperatura. Evidenciando que a diminuição na viscosidade lipídica devido ao aumento da temperatura não é um fator tão importante para as NLS nanopartículas lipídicas como o é para as formulações lipossomais, já que em nenhum dos casos, o aumento para Tf+10 °C e Tf+15 °C levou a mudanças significativas nas características físico-químicas das nanopartículas lipídicas. Entretanto, como o aumento da temperatura (Tf+10 °C e Tf+15 °C) durante o preparo não refletiram em nenhuma vantagem nas propriedades das nanopartículas lipídicas adotamos a

temperatura de 5 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido para a produção das nanopartículas lipídicas. Portanto, foram utilizados 63 °C para a produção dos CLN e 75 °C para as NLS, enquanto que 25 °C foram utilizados para o preparo das formulações lipossomais.

#### **4.2. Produção de nanopartículas por extrusão de microemulsão**

Após padronizarmos os parâmetros de produção de nanopartículas lipídicas utilizando o processo de extrusão de microemulsão, produzimos lipossomas neutros de EPC, CLN, lipossomas catiônicos de DOTAP e NLS (Tabela 7) através de extrusão de microemulsão com 15 passagens pela membrana de policarbonato com poros de 100 nm e temperatura do sistema a  $T_f+5$  °C. Todas as partículas produzidas tiveram diâmetro médio entre 100-200 nm, compatível com o poro da extrusão usado; os lipossomas de DOTAP apresentaram os maiores diâmetros (189,5 nm em média). A polidispersividade das amostras produzidas (Tabela 7) manteve-se abaixo de 0,200, o que indica boa homogeneidade da preparação.

Para carregamento de genes, partículas carregadas positivamente (catiônicas) são necessárias por permitir interação eletrostática com DNA (polianiónico), auxiliando ainda na internalização celular por endocitose (Elouahabi & Ruyschaert, 2005; Rejman *et al.*, 2005; Del Pozo-Rodrigues *et al.*, 2007); por isso, a presença de cargas positivas nas nanopartículas lipídicas é um ponto crucial para o sucesso da transfecção dessas partículas. Para isto, é essencial a utilização de lipídios catiônicos, como o DOTAP, nas formulações desenvolvidas.

A Tabela 7 apresenta, como esperado, baixos valores de potencial Zeta para os lipossomas zwitteriônicos de EPC, enquanto lipossomas de DOTAP apresentaram potencial zeta altamente positivo (+57,60 ±3,39 mV). As NLS apresentaram valores de potencial Zeta igualmente positivos (+40,65 ±5,49 mV), indicando que boa parte do DOTAP localiza-se na superfície externa da partícula, possibilitando assim a interação com o material genético. Além disso, este valor de potencial Zeta é um importante fator na estabilidade de suspensões lipídicas, pois valores do potencial acima de |30| mV

auxiliam na repulsão elétrica das partículas, evitando colisões e aglomerações entre elas (Schaffazick et al., 2003).

*Tabela 7- Características físico-químicas de lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS produzidas através do processo de extrusão de microemulsão com 15 passagens e  $T_f+5^\circ\text{C}$ . Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).*

	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>PDI</b>
Lipossomas de EPC	113,3 $\pm$ 9,7	2,90 $\pm$ 1,40	0,101 $\pm$ 0,010
CLN	115,7 $\pm$ 8,1	1,30 $\pm$ 1,42	0,131 $\pm$ 0,010
Lipossomas de DOTAP	189,5 $\pm$ 10,8	57,60 $\pm$ 3,39	0,127 $\pm$ 0,009
NLS	135,9 $\pm$ 10,3	40,65 $\pm$ 5,49	0,164 $\pm$ 0,007

Entretanto, lipídios positivos podem apresentar toxicidade quando administrados mais de uma vez, podendo induzir resposta inflamatória (Del Pozo-Rodrigues *et al.*, 2007). Com isto em mente, produzimos CLN sem lipídios catiônicos (Tabela 3) e que poderiam ser capazes de carrear quimioterápicos como a mitoxantrona. De fato, as CLN produzidas apresentaram (Tabela 7) potencial Zeta neutro (1,30  $\pm$ 1,42 mV), semelhante ao registrado em lipossomas de EPC. Tabatt e col. (2004) prepararam NLS (compostas de DOTAP, uma mistura de Span85 e Tween 80 como surfatante e cetilpalmitato como lipídio sólido) por homogeneização à alta pressão e as compararam com formulação correspondente de lipossomas contendo DOTAP, obtendo partículas de tamanho de 88  $\pm$ 22 nm para NLS e 228  $\pm$ 52 nm para os lipossomas. O potencial Zeta daquelas NLS foi positivo (+41,2  $\pm$ 1 mV) e ligeiramente superior ao dos lipossomas usados em comparação (+37,8  $\pm$ 0.9 mV), demonstrando que ambas as partículas possuiriam cargas superficiais similares, mas com tamanhos diferentes.

Feng e col. (2011) preparam CLN de compritol 888 ATO, EPC e Tween 80 por homogeneização à alta pressão e obtiveram partículas com diâmetros médios de 217,4 ±20 nm e potencial Zeta de -21,7mV ±0,9 mV. Em nossas formulações (Tabela 7), os CLN apresentaram diâmetro médio pouco menor (115,7 ±8,1nm) que as NLS (135,9 nm). Esses resultados indicam que o processo de produção por extrusão de microemulsão, nas condições otimizadas, produz partículas com diâmetro médio, potencial Zeta e PDI similares às partículas produzidas por homogeneização à alta pressão, mas também revelam a diversidade e amplitude de possibilidades de produção de tais partículas, em função da composição lipídica escolhida. De fato, os dados obtidos para as NLS e CLN estão de acordo com a caracterização físico-química em outros relatos da literatura (Olbrich *et al.*, 2001; Zuhorn *et al.*, 2002; Zuhorn *et al.*, 2002; Tabatt *et al.*, 2004; Anna, 2007).

Como obtivemos, com os parâmetros de números de passagens e temperatura do sistema otimizados na extrusão de microemulsão, partículas modelo com tamanho similar às produzidas com homogeneização à alta pressão, propusemo-nos a verificar a estabilidade das partículas, estocadas à 4 °C, ao longo do tempo.

### **4.3. Estabilidade físico-química das formulações produzidas**

Lipossomas são comumente descritos como partículas com baixa estabilidade de prateleira, com tendência à fusão e formação de agregados lipossômicos que podem levar à degradação de fármacos encapsulados durante o estoque (Couvreur *et al.*, 1995; Mehnert & Mäder, 2001; Martins *et al.*, 2007). Diferentemente, nanopartículas lipídicas são descritas como mais estáveis, podendo manter suas características físico-químicas por mais de 2 anos (Anna, 2007). Os resultados obtidos na Figura 13 mostram que mesmo em um relativo curto período de armazenamento, 180 dias, as formulações lipossomais de EPC e DOTAP apresentaram um repentino aumento no diâmetro médio. De fato, após 120 dias de armazenamento a 4 °C, há aumento de diâmetro médio acompanhado por progressivo aumento da polidispersividade (Figura 14), enquanto que, as formulações de NLS e CLN permaneceram estáveis por todo o período estudado.

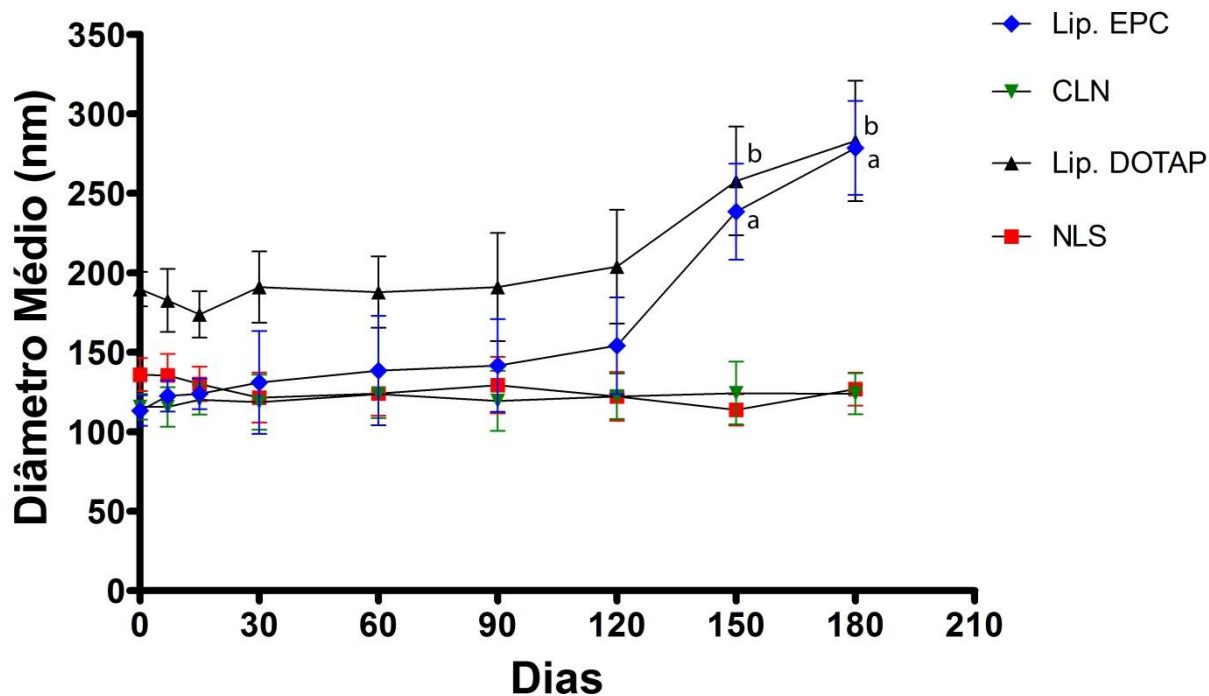


Figura 13 - Estabilidade do diâmetro médio dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS ao longo de 180 dias (6 meses), onde “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (0 dias) para lipossomas de EPC e “b” representa a mesma diferença para lipossomas de DOTAP. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

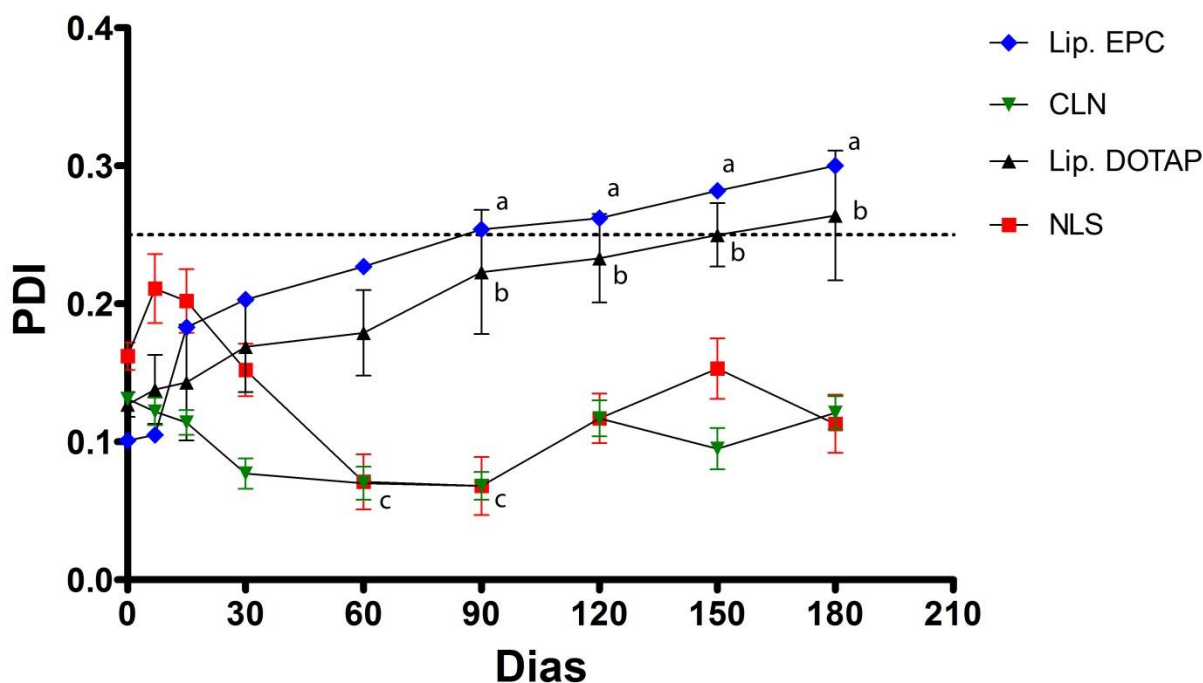


Figura 14 - Estabilidade do PDI dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS ao longo de 180 dias, onde “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (0 dias) para lipossomas de EPC; “b” e “c” representam a mesma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para lipossomas de DOTAP e NLS. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Além disso, na Figura 15 observa-se a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de potencial Zeta dos lipossomas de DOTAP, a partir de 60 dias de armazenamento, decaindo para valores menores que 30 mV. Nas demais formulações o potencial de superfície das partículas se manteve. A diminuição no valor de potencial Zeta nos lipossomas de DOTAP pode preceder a fusão dos lipossomas (aumento de diâmetro e PDI, que é evidente após 120 dias), indicando menor estabilidade destes lipossomas, em comparação as CLN e NLS.

Tanto os CLN quanto as NLS apresentaram potencial Zeta estável ao longo do armazenamento (Figura 15). Cabe ressaltar que os CLN se apresentaram estáveis por 6 meses, apesar de seu potencial Zeta ser neutro. Esse resultado demonstra a boa estabilidade física dos CLN, advinda, provavelmente, de sua ultraestrutura monolítica e

da presença do polímero Pluronic F68 em sua composição. Surfatantes, como o Pluronic F68, localizam-se na superfície das NLS e CLN e aumentam a estabilidade coloidal dessas partículas ao agirem como espaçadores entre as cabeças polares dos lipídios (Müller et al, 2000; Liu et al, 2009). No caso da CLN, a presença do surfatante pode ser um fator primordial para a estabilidade das partículas ao longo do tempo, já que os valores de potencial zeta próximos da neutralidade não favorecem repulsões eletrostáticas nas CLN para evitar a agregação entre as partículas. De fato, a repulsão eletrostática (potencial Zeta acima de  $|30|$  mV) é considerada, em literatura, como um dos principais fatores de estabilidade para essas partículas em suspensão (del Pozo Rodriguez et al., 2007). Além disso, as NLS preparadas em nosso laboratório (com potencial Zeta altamente positivo) apresentaram atividade como agentes de transfecção por até 2 anos (resultados não mostrados).

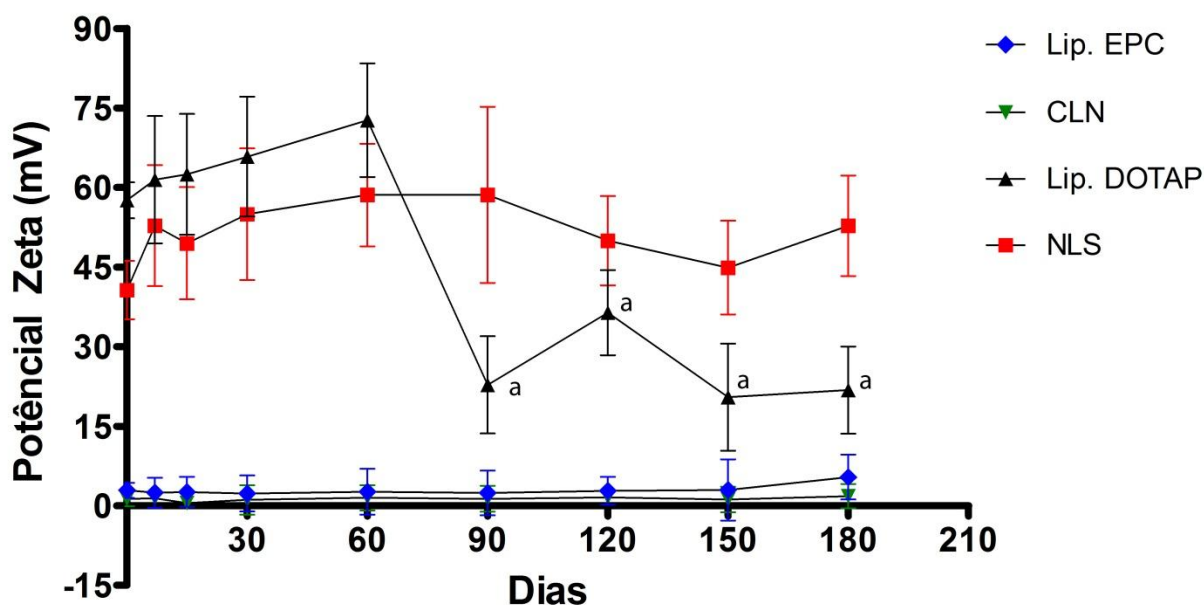


Figura 15 - Estabilidade do Potencial Zeta dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS ao longo de 180 dias, onde “a” representa a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (0 dias) para lipossomas de DOTAP. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).



Como obtivemos dados que sustentam o uso da extrusão de microemulsão como método alternativo à homogeneização à alta pressão para a produção de nanopartículas lipídicas e, essas, se apresentaram estáveis por até 180 dias (à 4°C), prosseguimos com estudos mais detalhados da estrutura dessas nanopartículas usando a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

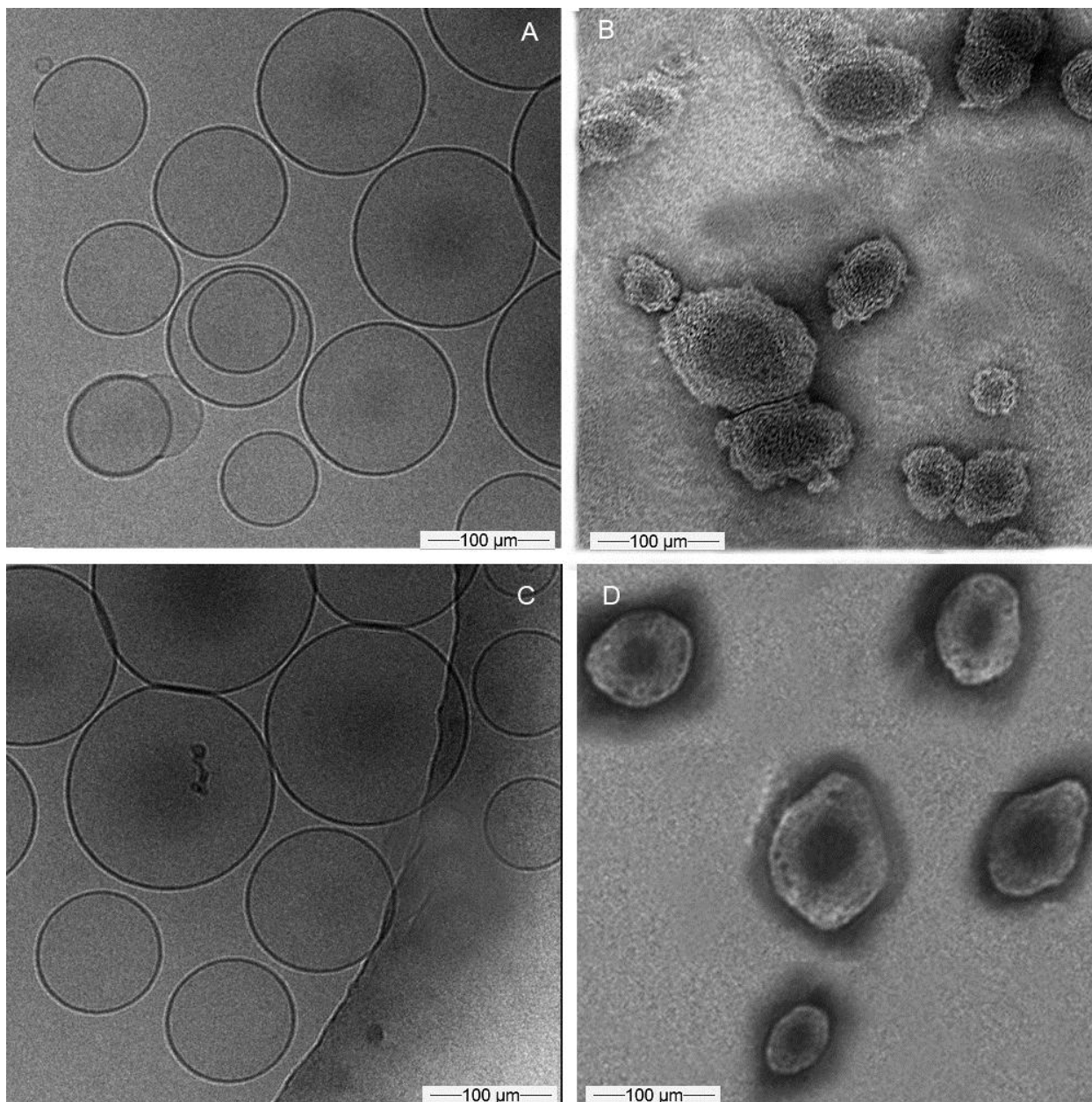
#### **4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A MET é uma das principais técnicas utilizadas para estudar a ultraestrutura de nanopartículas (Kuntsche et al., 2011). Por isso, as nanopartículas lipídicas obtidas através da extrusão de microemulsão foram comparadas com as formulações lipossomais. Na micrografia eletrônica, os lipossomas de DOTAP e EPC apresentam formato circular característico e diâmetros médios de 154,2 nm e 117,5 nm, respectivamente, também em boa correlação com os dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico (Tabela 7). As NLS (Figura 16) apresentaram ultraestrutura monolítica com formato esférico irregular e diâmetro médio em torno de 120 nm, o qual é bastante compatível com a medida de 135 nm, obtida por espalhamento de luz dinâmico (Tabela 7). As CLN apresentaram ultraestrutura monolítica com diâmetro médio de 127,5 nm (resultado próximo aos 115,7 nm medidos por espalhamento de luz dinâmico – Tabela 7), e formato esférico com mais reentrâncias que as NLS.

Recentemente, Feng e col. (2011) prepararam CLN, compostas de Compritol 888 ATO e EPC, e registraram por MET formatos esféricos para as partículas, com irregularidades semelhantes às observadas aqui, enquanto Pathak & Nagarsenker (2009) obtiveram imagens em que NLS de Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5 e Tween 80 apresentaram formato esférico e irregularidades nas bordas. Bunjes e col. (2007) registraram imagens de NLS formadas de triestearina e lecitina de soja, com formato esférico e que apresentam camadas concêntricas até o centro, sendo este de alta densidade eletrônica (núcleo escuro). Tal organização lipídica foi denominado, pelos autores, de forma  $\alpha$ , com distância entre as camadas de cerca de 5 nm. Para outras formulações, os autores ainda relataram NLS com formato circular e camadas orientadas em paralelo, que denominaram de modificação  $\beta$  cristalina, apresentando

listras com distâncias de 4,6 nm. A partir destes dados, os autores propuseram um modelo para o processo de solidificação que NLS formadas por triestearina e lecitina de soja. Segundo este modelo, as NLS, ainda aquecidas, se apresentam como partículas em emulsão. Com o resfriamento, sua parede externa começa se solidificar até que as partículas fiquem na forma  $\alpha$ . Com o aumento da temperatura e ao longo do tempo, as NLS podem formar partículas com modificação  $\beta$  cristalina, causando a expulsão dos fármacos da sua matriz sólida.

Em nossas partículas, podemos verificar, nas NLS e CLN, um centro com alta densidade eletrônica (região escura no interior da partícula), como descrito por Bunjes e col. (2007), bem como as camadas concêntricas ao seu redor, sugerindo que as partículas produzidas estariam na forma  $\alpha$  cristalina.



*Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): A) lipossomas de EPC; B) Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN); C) lipossomas de DOTAP; D) Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS). Imagens ampliadas a 130.000x.*

Utilizamos, também, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) para obter maiores detalhes sobre a cristalinidade das partículas e a organização dos lipídios no núcleo das nanopartículas lipídicas.

#### 4.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para melhor caracterizarmos sistemas lipídicos produzidos, recorreremos à Calorimetria Diferencial de Varredura, cujos resultados estão mostrados na Figura 17. Preparamos as amostras de forma que essas passassem, primeiramente, pela extrusão de microemulsão (aquecimento relativo de cada nanopartícula) e, posteriormente, fossem submetidas ao calorímetro. Assim, pudemos minimizar quaisquer efeitos advindos pelo aquecimento prévio das partículas em relação aos seus componentes.

Para a faixa analisada, de 10 a 90 °C, o ácido esteárico apresentou um pico endotérmico a 67,09 °C, correspondente à temperatura de transição sólido líquida. Igualmente o monoestearato de glicerila apresentou ponto de fusão em 54,30°C; estes valores estão de acordo com as temperaturas de fusão da literatura para ácido esteárico puro com 69,00 °C (Zhang *et al.*, 2009) e monoestearato de glicerila com 53,07 °C (Nayak *et al.*, 2010). Lipossomas de EPC e lipossomas de DOTAP não apresentaram transições térmicas na faixa analisada, o que era esperado, considerando-se que as temperaturas de fusão do EPC e DOTAP são -15°C e -11,9°C, respectivamente, ou seja, fora da faixa analisada. Já as partículas lipídicas CLN e NLS apresentaram transições endotérmicas de pequena intensidade a 53,10 ° e 62,89 °C, respectivamente, compatíveis com resquícios cristalinos de seus respectivos constituintes: ácido esteárico e monoestearato de glicerila.

O surfatante Pluronic F68 possui ponto de fusão à 55 °C (Tsui, 2008), porém tal transição não foi registrada (Figura 17). É possível que o aquecimento da amostra acima de 60 °C (temperaturas usadas na produção de NLS e CLN) e posterior resfriamento influenciaram a organização do Pluronic, tornando-o insensível a novos aquecimentos para a faixa analisada. Tsui (2008) relatou diminuição na capacidade de micelização do Pluronic F68, em temperaturas superiores a 55 °C. Esse autor correlacionou o aumento da temperatura com o favorecimento da conformação hexagonal dos polímeros, devido a quebras de ponte de hidrogênio entre os monômeros do Pluronic e o solvente (Tsui, 2008), justificando a mudança na agregação. Além disso, a concentração de Pluronic F68 é menor que dos outros

componentes (Tabela 3) e o surfatante encontra-se distribuído na superfície das partículas (Torcello-gomez, 2011), justificando a não observação de transição de fases.

A queda da endoterma das partículas (CLN e NLS) em relação aos lipídios puros (monoestearato de glicerila e ácido esteárico) sugere perda da cristalinidade daqueles compostos, ao se incorporar o 2º lipídio (EPC ou DOTAP, respectivamente) e surfatante Pluronic F68 (Pathak & Nagarsenker, 2009) às partículas. Por isto, calculamos a cristalinidade das partículas ( $W_c$ ) que pode ser acessada pela Equação 1 (Munaro, 2007).

$$W_c = 100 \times \frac{\Delta H_{f,a}}{\Delta H_{f,c}} \quad (1)$$

onde  $\Delta H_{f,a}$  é a entalpia de fusão da amostra (CLN e NLS) e  $\Delta H_{f,c}$  é a entalpia de fusão do lipídio puro (monoestearato de glicerila e ácido esteárico, respectivamente). Essas informações foram obtidas através da integração dos picos calorimétricos, já que a área do pico é proporcional à sua entalpia de fusão. Desta forma, determinamos graus de cristalinidade de 5,31 % para as CLN e 8,03 % para NLS. Segundo Hou e col. (2007), esta queda dos picos e a baixa cristalinidade das NLS e CLN demonstra que a associação com os óleos (EPC e DOTAP e, que apresentam temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalino de -15 °C e -11,9 °C, respectivamente) impede a formação de uma estrutura cristalina rígida no interior das partículas (com monoestearato de glicerila e ácido esteárico, respectivamente) tal que ambos os lipídios formadores de bicamadas, atuam de forma similar ao desestabilizar a estrutura cristalina do interior das partículas de CLN e NLS. Os núcleos densos, vistos na microscopia eletrônica (item 4.5) devem representar, então, um mistura de lipídios sólidos e óleos.

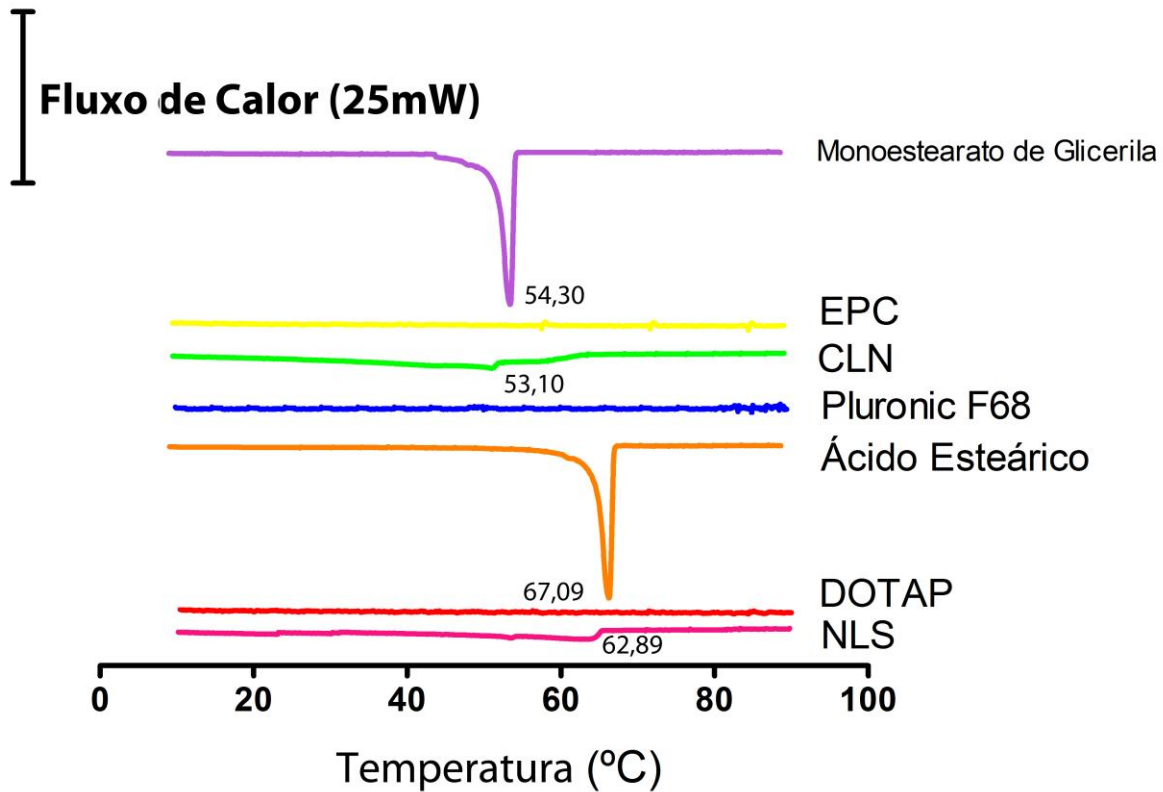


Figura 17- Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), de amostras de (de cima para baixo): monoestearato de glicerila, EPC, CLN, Pluronic F68, ácido esteárico, DOTAP e NLS. Resultados representativos de 3 experimentos independentes (n=3).

Como podemos ver, as CLN e NLS produzidas nesta dissertação apresentaram perfis térmicos semelhantes, levando-se em conta a diferença de temperatura de fusão dos lipídios sólidos. Assim, a análise calorimétrica não comprovou a existência de um núcleo sólido nas NLS de ácido esteárico com DOTAP e que fosse claramente diferente da organização do interior lipídico das CLN de monoestearato de glicerila com EPC.

Em seguida, testamos a liofilização com e sem crioprotetores, das partículas lipídicas produzidas.

#### **4.6. Liofilização**

A liofilização é um dos métodos mais utilizados para obter formulações desidratadas, possibilitando assim que sejam estocadas e transportadas com menor custo e maior facilidade. Entretanto, este processo requer três transformações que podem comprometer a estabilidade de partículas: congelamento, sublimação aquosa sob vácuo e redispersão antes do uso. Dessas, a cristalização da água em gelo nas suspensões é o principal fator impactante para estabilidade das partículas; tal que, para atenuar o impacto desta transformação, carboidratos (em especial dissacarídeos) podem ser utilizados como crioprotetores (Allison *et al.*, 2000; Del Pozo-Rodriguez *et al.*, 2009).

Os fatores determinantes para que um crioprotetor seja eficiente incluem: uma alta temperatura de transição vítrea, baixa higroscopia, baixa taxa de cristalização e não possuir nenhum grupo redutor. A trealose e a sacarose são dissacarídeos que apresentam essas características e, por isso, são os mais utilizados em literatura (Allison *et al.*, 2000; Hinrichs *et al.*, 2001; Del Pozo-Rodriguez *et al.*, 2009).

Testamos estes dois crioprotetores na liofilização de CLN, NLS e lipossomas, comparando características físico-químicas de partículas não liofilizadas e liofilizadas sem crioprotetor e os resultados obtidos estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Liofilização dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS com e sem crioprotetor (trealose e sacarose) e sua caracterização físico química por diâmetro médio, potencial Zeta e polidispersão (PDI). (\*) representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com o diâmetro médio e (\*\*) diferença com o PDI, ambos, em relação às partículas não liofilizadas. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

	Não Liofilizado			Liofilizado sem Crioprotetor			Liofilizado com Trealose			Liofilizado com Sacarose		
	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
<b>Lip. EPC</b>	147,7 ±11,4	4,62 ±5,82	0,327 ±0,030	4994,0 ±201,2*	25,34 ±5,09	1,000 ±0,000**	135,3 ±14,8	4,65 ±5,92	0,453 ±0,034**	163,6 ±14,4	3,59 ±6,24	0,342 ±0,036
<b>CLN</b>	131,5 ±10,4	12,43 ±7,98	0,135 ±0,030	6095,1 ±200,8*	26,79 ±9,45	1,000 ±0,000**	137,7 ±14,8	5,84 ±4,74	0,124 ±0,043	197,7 ±29,0	2,65 ±7,77	0,235 ±0,038
<b>Lip. DOTAP</b>	190,7 ±17,7	55,23 ±7,30	0,275 ±0,032	1658,8 ±375,6*	64,83 ±6,19	0,996 ±0,010**	304,3 ±10,6*	60,29 ±14,73	0,329 ±0,038**	151,8 ±17,6	52,98 ±15,89	0,579 ±0,039**
<b>NLS</b>	140,8 ±15,8	48,32 ±10,32	0,182 ±0,035	1493,8 ±169,4*	60,33 ±14,98	1,000 ±0,000**	147,3 ±21,0	58,88 ±7,38	0,154 ±0,034	156,5 ±17,8	55,23 ±4,53	0,178 ±0,038



Os dados da Tabela 8 mostram que todas as partículas liofilizadas sem crioprotetor apresentaram grande aumento do tamanho e polidispersão, demonstrando agregação das nanopartículas frente ao estresse físico do processo, o que inviabiliza o uso da liofilização como método de armazenamento das partículas nessas condições (sem crioprotetor). Dentre os crioprotetores utilizados, partículas com trealose apresentaram características mais próximas às partículas não liofilizadas, enquanto que o uso de sacarose produziu partículas com diâmetro médio e PDI ligeiramente superiores às correspondentes amostras não liofilizadas. Estes resultados estão de acordo com dados obtidos na literatura, em que suspensões de NLS e CLN liofilizadas com trealose apresentaram menor tendência de agregação que as liofilizadas na presença de sacarose e monossacarídeos como glicose (Allison *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2004; Del Pozo-Rodriguez *et al.*, 2009), não tendo efeitos na citotoxicidade, nem diminuição na taxa de transfecção dessas formulações (Del Pozo-Rodriguez *et al.*, 2009).

Para lipossomas, nossos resultados demonstram a necessidade de crioprotetor para sua estabilidade, pois os valores de polidispersão se apresentaram superiores aos níveis recomendados pela literatura (Tabatt *et al.*, 2004). Em relação aos lipossomas liofilizados em presença de crioprotetores, houve um ligeiro aumento do diâmetro médio desses (de até 60 nm) e significativo aumento da polidispersão. Isso indica que os crioprotetores possuem um papel fundamental na reconstituição dos lipossomas, entretanto, mesmo em presença de crioprotetores houve um aumento na heterogeneidade das partículas. Cabral e colaboradores (2004) relataram resultados similares com os obtidos em nosso laboratório, com aumento de 30-40 nm no diâmetro médio e polidispersão entre 0,2 e 0,4, após liofilização de lipossomas de EPC e colesterol com trealose, enquanto que os lipossomas liofilizados sem crioproteção apresentaram alta heterogeneidade ( $PDI \approx 1,0$ ) e grande aumento do diâmetro médio, indicando fusão e agregação destas partículas.

A literatura indica que os crioprotetores, em especial a trealose, tem um papel fundamental de estabilização, resultante da ligação dos grupos hidroxila ( $OH^*$ ) dos dissacarídeos com o grupamento fosfato dos fosfolipídios, por pontes de hidrogênio,

evitando a fusão das partículas e danos nos fosfolipídios, causados pela desidratação. Apesar de promissora, é ainda necessário aperfeiçoar a crioproteção para minimizar os efeitos do congelamento sobre as formulações de lipossomas, algo não tão necessário para NLS e CLN, devido a sua maior estabilidade em relação aos lipossomas (Chen *et al.*, 2010), como evidenciam os dados da Tabela 8.

Em seguida, analisamos a incorporação e liberação do fármaco mitoxantrona (carreamento de fármacos) e a interação e proteção do material genético com as partículas lipídicas (carreamento de genes).

#### **4.7. Carreamento de Fármacos (*Drug Delivery*)**

A mitoxantrona (Figura 1) é um quimioterápico capaz de se intercalar ao DNA, além de apresentar uma alta capacidade de inibir a topoisomerase II. Esses efeitos resultam em um comprometimento da síntese de RNA e conseqüente morte celular (Goodin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). A hidrofobicidade da mitoxantrona lhe permite atravessar barreiras biológicas (biomembranas) sem a necessidade de carreadores específicos e elicitar seu efeito citotóxico (Burns *et al.*, 2002). Porém, células expostas ao tratamento com esse composto podem desenvolver resistência ao fármaco, principalmente células bastante indiferenciadas, como as de câncer de mama (Zhang *et al.*, 2011). Com isto, doses cada vez maiores são necessárias para induzir o efeito terapêutico, pronunciando cada vez mais seus efeitos colaterais. Para evitar tais desvantagens, uma alternativa seria utilizar sistemas de carreamento de fármacos, pois esses podem aumentar a concentração intracelular do composto, revertendo, assim, a resistência ao tratamento (Alexis *et al.*, 2008a).

Para testar essa hipótese, produzimos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS contendo 5 mmol.L<sup>-1</sup> de mitoxantrona. A caracterização físico-química dos carreadores com e sem mitoxantrona, tamanho e potencial Zeta é apresentada na Tabela 9.

Os lipossomas de EPC não apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em seu diâmetro, bem como os lipossomas de DOTAP e as NLS, quando adicionados de mitoxantrona. Entretanto, os CLN apresentaram diâmetro ligeiramente maior que o das

partículas não carregadas com o fármaco. Este fato pode se relacionar com a quantidade ou forma de encapsulação do fármaco na partícula. Os valores de PDI sofreram ligeiro aumento para as partículas de CLN, porém, em nenhum dos casos ultrapassou 0,300, indicando boa homogeneidade das formulações, conforme Gasco (2007).

Em relação ao potencial Zeta, não houve alteração significativa nos valores do potencial de superfície das partículas, a não ser para as NLS. Como a mitoxantrona possui carga positiva em pH fisiológico ( $pK_a$  da mitoxantrona entre 8,3-8,6 (Mahoney et al., 2003; Raghunand et al., 2003)), a não alteração do potencial zeta pode demonstrar que o fármaco não está na superfície, mas, sim, no interior das nanopartículas lipídicas. No caso das NLS, houve diminuição significativa do potencial de superfície (positivo pela presença de DOTAP), indicando reorganização dos lipídios da superfície das NLS para incorporação da mitoxantrona, justificando a alteração nas cargas superficiais.

*Tabela 9 - Caracterização físico-química dos lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS produzidos com e sem Mitoxantrona. (\*) representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para diâmetro médio do carreador vazio; (\*\*) para diferença do Potencial Zeta em relação ao carreador vazio e (\*\*\*) para diferença estatística em relação ao PDI do carreador vazio. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).*

	Carreador vazio			Carreador com Mitoxantrona		
	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
Lip. EPC	134,2 ±14,6	1,53 ±1,98	0,143 ±0,020	136,7 ±13,5	-1,38 ±2,65	0,157 ±0,020
CLN	122,5 ±13,4	1,95 ±0,53	0,129 ±0,018	142,2 ±15,5*	1,64±0,75	0,181 ±0,011***
Lip. DOTAP	160,8 ±12,3	54,97 ±4,29	0,175 ±0,026	171,2 ±14,6	50,12 ±5,26	0,186 ±0,015
NLS	130,8 ±10,6	41,68 ±1,49	0,162 ±0,035	138,0 ±18,7	31,81 ±1,82**	0,174 ±0,011

Para demonstrar a incorporação do ativo nos carreadores, quantificamos a mitoxantrona carregada pelas partículas através de filtração das suspensões (para eliminar a mitoxantrona não incorporada) ruptura das partículas com o uso de solução de SDS a 20 % e medição da absorbância da amostra a 672 nm, em comparação com a curva-padrão de quantificação (Figura 6). Para este teste, os carreadores foram, então, diluídos para se obter a mesma concentração ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de carreador) nos ensaios. Os resultados obtidos estão representados na Figura 18.

Para a concentração final de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de mitoxantrona nos carreadores, a encapsulação da mitoxantrona obtida foi de 10 % nos lipossomas de EPC (correspondente a  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), 81% nos CLN ( $4,01 \text{ mmol.L}^{-1}$  do fármaco carregado), 14 % nos lipossomas de DOTAP ( $0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$  do fármaco incorporado) e 64 % nas NLS (correspondente a  $3,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  do ativo realmente incorporado).

Como a solubilidade da Mitoxantrona em água é muito baixa (ordem de 2 mg/L) (Budavari, 1996), podemos inferir, a priori, que a diferença observada entre a incorporação do fármaco para lipossomas e nanopartículas lipídicas está relacionada com a diferença de lipídio total nas formulações. De fato, as nanopartículas lipídicas (CLN e NLS) possuem, cerca de duas vezes mais lipídios totais ( $10$  e  $9,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  para CLN e NLS, respectivamente), em relação aos lipossomas ( $5$  e  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  para Lipossomas de EPC e lipossoma de DOTAP). Entretanto, a diferença de incorporação (cerca de 4 vezes maior para nanopartículas lipídicas, em relação aos lipossomas) não faz jus à esta proporção lipídica diminuída (nanopartículas lipídicas possuem cerca do dobro de lipídios totais em relação aos lipossomas). Acreditamos, portanto, que a diferença de incorporação está, de fato, na ultraestrutura maciça das nanopartículas lipídicas, em comparação com a fina bicamada dos lipossomas, como mostrado na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 16). Além disso, para vesículas unilamelares de EPC, Lim e col. (1997) relataram haver a necessidade de um gradiente transmembranar de pH, juntamente com aumento da temperatura ( $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para aumentar a incorporação da mitoxantrona em lipossomas; sem tal artifício, esses autores relataram menos de 15 % de encapsulação do fármaco, o que está de acordo com os resultados por nós obtidos.

Para CLN compostas de triglicerídeos de cadeia média, há autores que mostram encapsulação de até 83,7 % de mitoxantrona (Li *et al.*, 2010). Para NLS, Lu e col. (2006) registraram 87 % de encapsulação de mitoxantrona, enquanto que a nossa formulação apresentou encapsulação menor que a descrita, com 64 %. Este menor valor, em comparação com a CLN, pode estar relacionado com a repulsão eletrostática ocasionada entre DOTAP (lipídio catiônico) e a mitoxantrona que, em pH fisiológico, apresenta-se em sua forma catiônica (Mahoney *et al.*, 2003; Raghunand *et al.*, 2003).

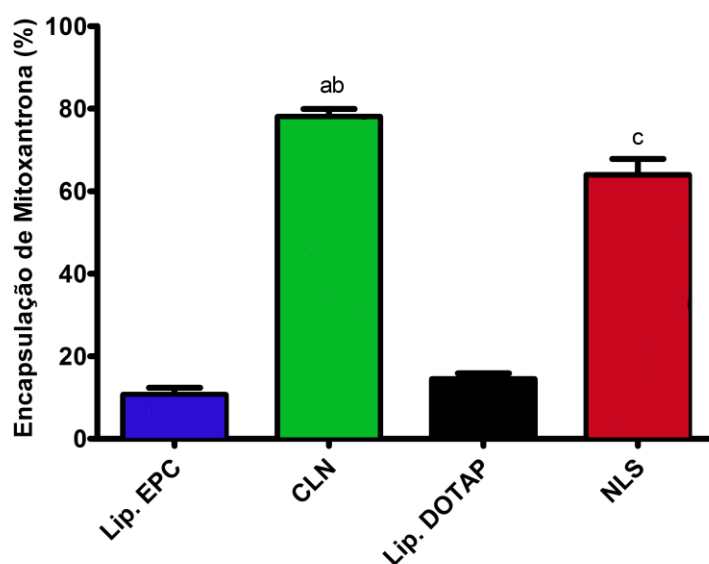


Figura 18 – Porcentagem de mitoxantrona carregada nos veículos: lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS. "a" - representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com lipossomas de EPC; "b" - diferença significativa com NLS; "c" - diferença com lipossomas DOTAP. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Como os fármacos somente podem agir ao estarem em seu sítio-alvo, é necessário que a mitoxantrona incorporada nas nanopartículas lipídicas seja liberada do carreador ao longo do tempo. Então, analisamos a liberação *in vitro* de mitoxantrona dessas partículas, ao longo de 72 horas, com a utilização de células de Franz adaptadas para o uso de membrana de diálise. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 19.

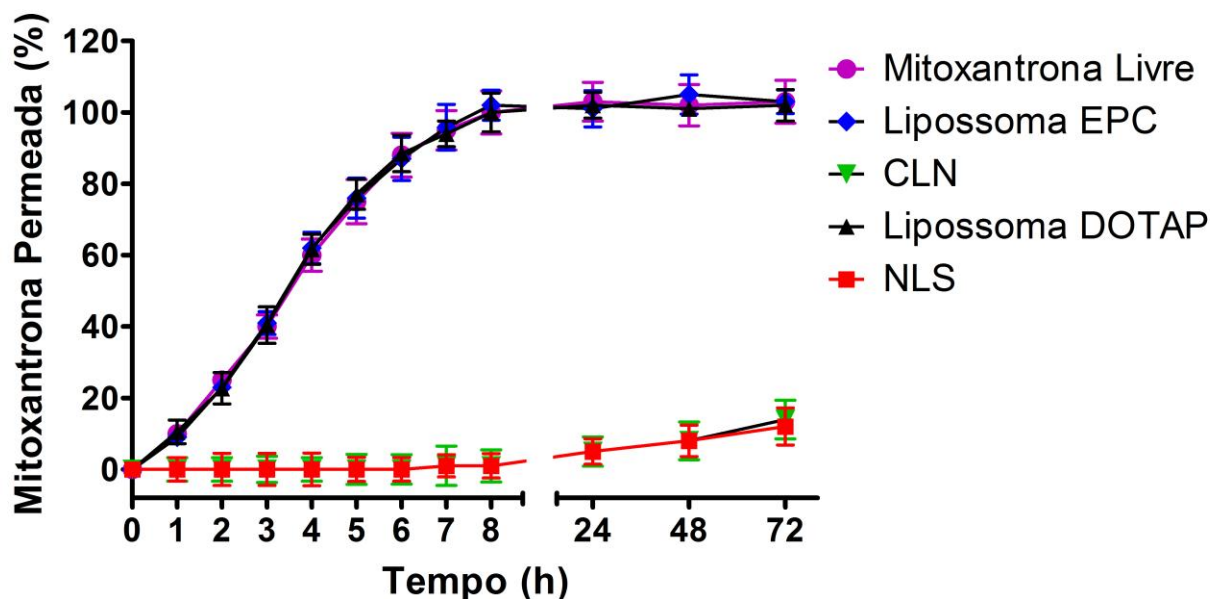


Figura 19 – Cinética de liberação in vitro de mitoxantrona livre e carregada por lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em tampão PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente (n=2)

Os dados da Figura 19 mostram que a permeação total de mitoxantrona livre, através da membrana, ocorre em cerca de 8 horas. Ambos os lipossomas (EPC e DOTAP) apresentaram perfis semelhantes aos do fármaco livre, o que é compatível com a baixa encapsulação do fármaco nesses carreadores (Figura 18). Além disso, Lim et al (1997) relatam resultados semelhantes, já que registram incorporação menor de 15 % de mitoxantrona em lipossomas de dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e colesterol e cinética de liberação próxima do fármaco livre após 72 h de ensaio.

As NLS e CLN, entretanto, mostraram um perfil bem diferente, com 10,4 e 12,7 %, respectivamente, de liberação de mitoxantrona no tempo máximo transcorrido no ensaio (72 horas). Esses dados estão de acordo com a literatura, na qual Lu e col. (2005) relatam permeação de 7,8 h para o fármaco livre em PBS enquanto que para NLS (formadas de EPC, Tergitol<sup>®</sup> S-40 e Compritol<sup>®</sup> 888) com mitoxantrona, obtiveram 80 % da droga livre somente após 600 horas de permeação. Neste ensaio, não

verificamos possíveis efeitos de expulsão do fármaco (*Burst Effect*), comumente relatados com NLS na literatura (Gasco, 2007), até 72 h de permeação.

Na próxima etapa, avaliamos a interação desses veículos modelo (sem mitoxantrona) como carreadores de genes (*gene delivery*).

#### **4.8. Carreamento de genes (*gene delivery*)**

O carreamento de materiais genéticos, e.g. DNA, RNA, siRNA, entre outros, através de sistemas virais ou não-virais é vital para a utilização dessas macromoléculas para fins terapêuticos. Os ácidos nucleicos, biopolímeros carregados negativamente (poliânions), além de serem incapazes de atravessar biomembranas, devido sua carga aniônica e ausência de transportadores membranares, são alvos de diversas enzimas capazes de degradar esses materiais: as nucleases. Portanto, a interação desses materiais com o seu sistema de carreamento é a primeira etapa no desenvolvimento desses veículos.

Testamos a capacidade das formulações de lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS interagirem com DNAP utilizando o teste de retardamento na mobilidade eletroforética (EMSA), mostrado na Figura 20. Esse teste consiste em separar o DNAP que não interagiu com as partículas, através de eletroforese, permeando o gel de agarose e se tornando disponível para visualização através do corante Brometo de Etídio, enquanto que o material que interagiu eletrostaticamente com os carreadores fica retido no poço inicial (retardamento da mobilidade eletroforética).

Os resultados mostram que as formulações lipossomas de EPC e as CLN apresentam bandas de DNAP livre, representando 96,9 % e 88,8 % do total aplicado, respectivamente; indicando que essas formulações não foram capazes de interagir com o DNAP. Isso se deve ao fato dessas formulações não apresentarem lipídio catiônico em sua constituição, e.g. DOTAP. Já as formulações de lipossomas de DOTAP e NLS foram capazes de reter 97,8 % e 99,2 % do DNAP, respectivamente, indicando que nas concentrações testadas essas formulações são capazes de interagir com praticamente todo material genético disponível.



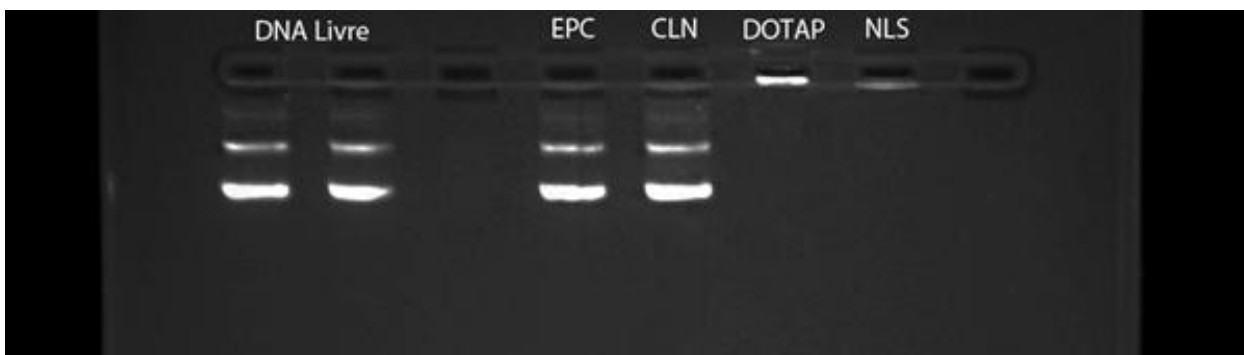


Figura 20 - Avaliação da interação DNAP com os veículos: lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em gel de agarose 1,3 %.

A segunda etapa de desenvolvimento dessas partículas para carreamento de material genético consistiu em avaliar se os veículos seriam capazes de proteger o material genético carregado de suas enzimas degradadoras, como a DNase I (Del Pozo-Rodriguez et al., 2007). Neste ensaio, após o ataque enzimático por DNase I, SDS foi aplicado para interromper a ação enzimática e, ao mesmo tempo, solubilizar as partículas lipídicas e o material genético resultante (protegido) pode ser visualizado em eletroforese. A análise de proteção contra DNase foi realizada (Figura 21) em gel de agarose a 1,3 %, após a ação da enzima DNase I.

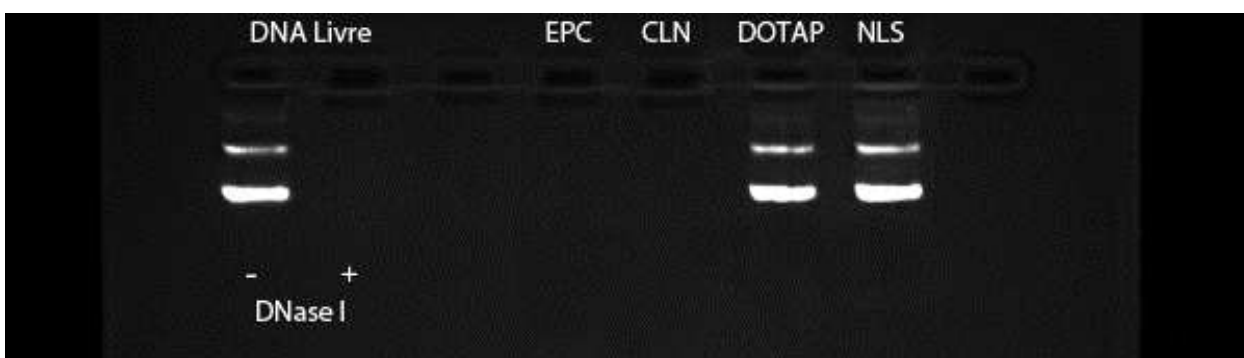


Figura 21 - Avaliação da proteção contra enzimas degradadoras de DNA (DNase I) das amostras: DNAP livre sem (-) e com (+) DNase I, seguido pelo DNAP com carreadores: lipossomas de EPC, CLN, lipossomas de DOTAP e NLS em gel de agarose 1,3 %.

Na Figura 21 temos dois controles: DNA livre sem (-) e com (+) DNase I, demonstrando que a enzima está funcional. Em seguida vemos que praticamente todo DNAP foi digerido pela enzima nos lipossomas de EPC e CLN, mas quase a totalidade desse é protegido pelo lipossomas de DOTAP e NLS (respectivamente, 97,8 % e 99,1 % de DNAP recuperado após ação da enzima). Isso pode ser explicado pela não compactação do DNAP nas partículas de lipossomas de EPC e CLN, por não haver interação eletrostática entre esses, como demonstrado na Figura 20. Em contrapartida, lipossomas de DOTAP e NLS, interagem com esse material genético e o compactam de forma que a degradação do DNAP pela DNase I é inibida.

Os resultados obtidos aqui estão de acordo com aqueles descritos por Pozo-Rodríguez e col. (2007) que, utilizando NLSs produzidas com o lipídio Precirol® ATO 5, DOTAP e Tween 80 demonstraram que o grau de compactação do DNAP determina o grau de proteção à ação de DNase I. Esses autores demonstraram que a condensação e proteção do material carregado da degradação citoplasmática é uma característica muito importante em um sistema de sistemas de transferência de genes (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2007).

Com ambos os sistemas de carregamento de genes e de fármacos caracterizados pudemos, então, analisar a eficiência dos carreadores para o transporte de fármacos e material genético, concomitantemente, através do teste de viabilidade celular.

#### **4.9. Teste de Viabilidade Celular**

Após demonstrar que as nanopartículas lipídicas podem carrear fármacos e genes, procedemos com a avaliação da citotoxicidade dessas formulações em células de fibroblastos Balb/3T3 (não cancerígena) e células de câncer de mama e próstata.

Primeiramente, realizamos a curva dose-resposta (Figura 22) para medir a dose de MTX capaz de reduzir a viabilidade celular a 50 % (IC<sub>50</sub>) das linhagens fibroblásticas Balb/3T3, de câncer de próstata PC3 e de câncer de mama MCF-7 (sensíveis ou resistentes à mitoxantrona).

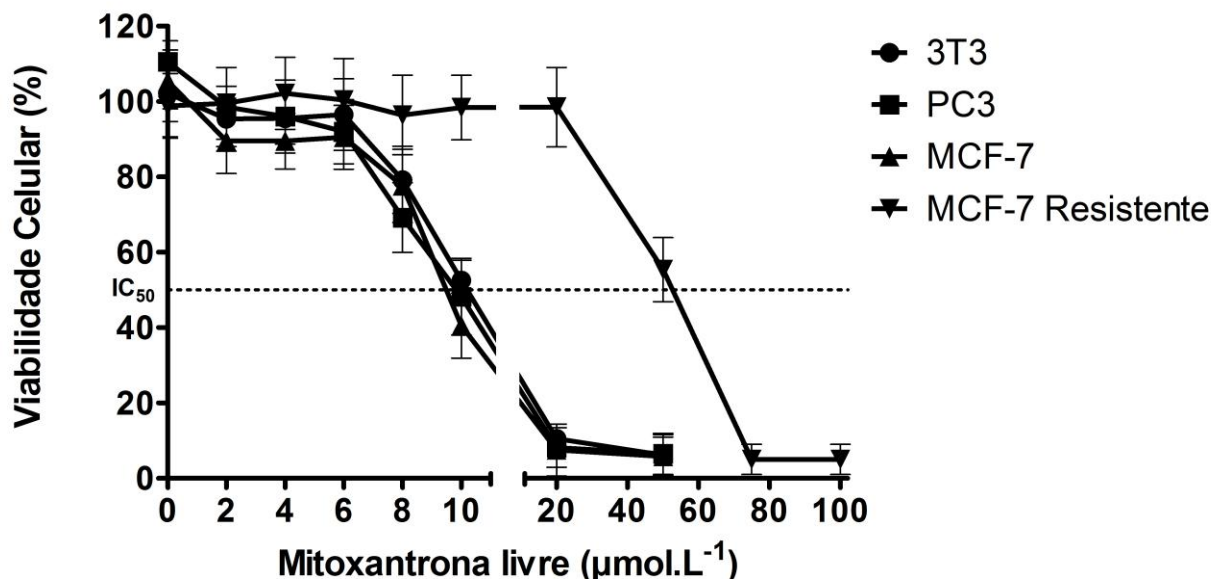


Figura 22 - Curva dose-resposta das linhagens celulares Balb/3T3, PC3, MCF-7 susceptível e MCF-7 resistente, medida pelo teste de MTT. Porcentagem da viabilidade celular em função da concentração de mitoxantrona.

Pudemos visualizar que, nas condições de ensaio, as 3 linhagens sensíveis à mitoxantrona possuem uma  $IC_{50}$  próximo de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , com exceção para MCF-7 resistente, cujo valor foi 5 vezes maior ( $IC_{50}$  de  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Como discutido anteriormente, encapsulamos mitoxantrona nas nanopartículas lipídicas para tentar reverter a resistência apresentada pelas células de câncer. Por outro lado, o carregamento de material genético (que se utiliza de um plasmídeo) depende de um sistema de carregamento para que este desempenhe seu papel biológico, uma vez que o plasmídeo é uma macromolécula carregada negativamente, o que a torna incapaz de atravessar passivamente biomembranas (Liu et al., 2007).

Com isso em mente, avaliamos a atividade citotóxica das formulações em linhagem de células de fibroblastos de rato (Balb/3T3), utilizando o teste de MTT. Na Figura 23 observamos os resultados para lipossomas de DOTAP e NLS e, na Figura 24, os resultados com os lipossomas de EPC e CLN. Os resultados obtidos permitem já numa primeira observação, concluir que os sistemas de carregamento não apresentam toxicidade intrínseca (viabilidade celular acima de 90 %).

A Figura 23 apresenta resultados das formulações de lipossomas de DOTAP e NLS, contendo ou não os ativos: mitoxantrona, gene da PTEN ou ambos. Somente a mitoxantrona livre ou formulações de lipossomas de DOTAP com mitoxantrona, bem como conjugado com o gene da PTEN e mitoxantrona, apresentaram uma toxicidade significativa para as células Balb/3T3. A mitoxantrona encapsulada em lipossomas de DOTAP reduziu a viabilidade celular a 62,8 % e lipossomas com MTX e plasmídeo reduziram a viabilidade a 58,8 %. Este fato pode ser explicado pela baixa capacidade de encapsulação de mitoxantrona pelos lipossomas de DOTAP (13,8 %, Figura 18). É provável que a mitoxantrona livre nas formulações lipossomais foi capaz de diminuir a viabilidade das células de Balb/3T3, uma vez que o controle tratado com mitoxantrona livre reduziu a 50,8 % a viabilidade daquelas células. Interessante destacar que a citotoxicidade intrínseca da mitoxantrona ( $p < 0,05$ ) foi mitigada em todas as formulações de NLS, contendo ou não plasmídeo.

Na Figura 24 são apresentados os dados obtidos com lipossomas de EPC e CLN, contendo mitoxantrona, plasmídeo para codificar PTEN ou mitoxantrona e plasmídeo. Os resultados obtidos para os lipossomas de EPC (Figura 24) são similares aos apresentados por lipossomas de DOTAP (Figura 23), uma vez que ambos não carregam quantidades significativas de mitoxantrona.

A exemplo das NLS, a grande eficiência de encapsulamento de mitoxantrona nas CLN (81,4 %, Figura 18) também resultou em proteção da citotoxicidade da mitoxantrona sobre a viabilidade celular, em relação ao fármaco livre.

Ambos resultados mostram que a mitoxantrona, na concentração testada de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , apresenta um efeito citotóxico aos fibroblastos, linhagem não-cancerígena, entretanto, quando encapsulada pela CLN ou NLS, este efeito é diminuído, não havendo citotoxicidade resultante da incorporação do fármaco nos carreadores. Também é possível observar que as formulações contendo o gene para a PTEN não apresentaram efeitos citotóxicos para as células não cancerígenas.

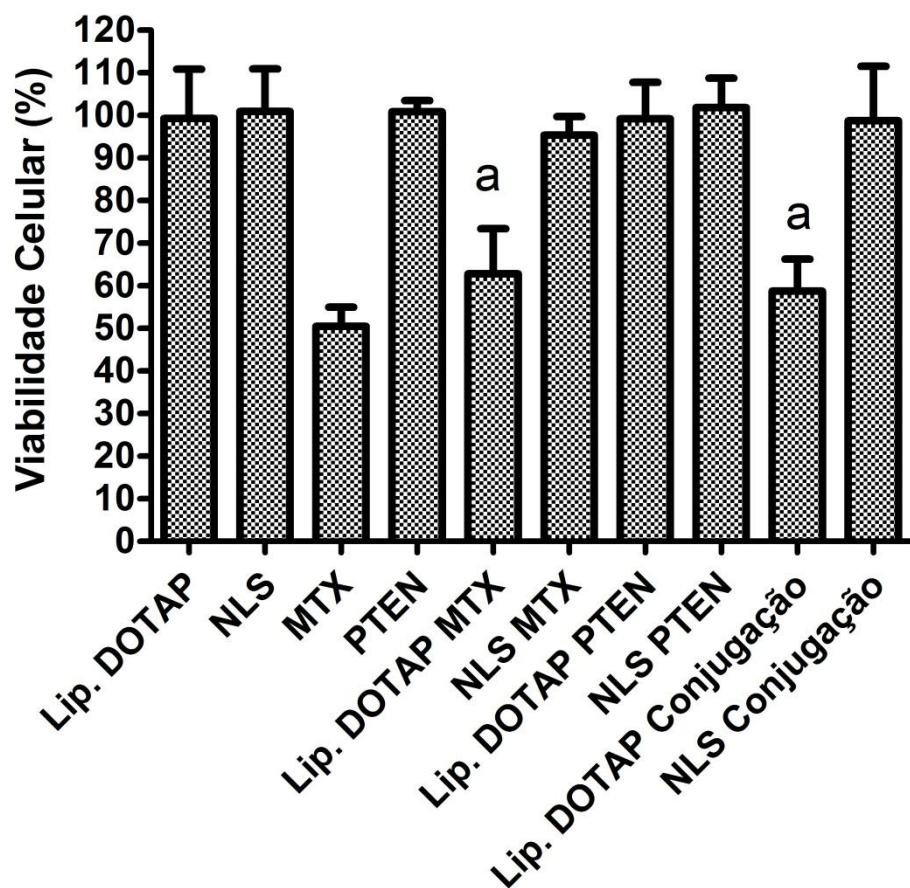


Figura 23 – Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de fibroblastos embriônicos de camundongo (Balb/3T3) tratados por 24h com lipossomas de DOTAP vazios (Lip. DOTAP); NLS vazia (NLS);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulado em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em NLS (NLS MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em NLS (NLS PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP Conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em NLS (NLS Conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ). “a” representa diferença estatística ( $p<0,05$ ) em comparação com lipossomas de DOTAP vazios (Lip. DOTAP); Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.

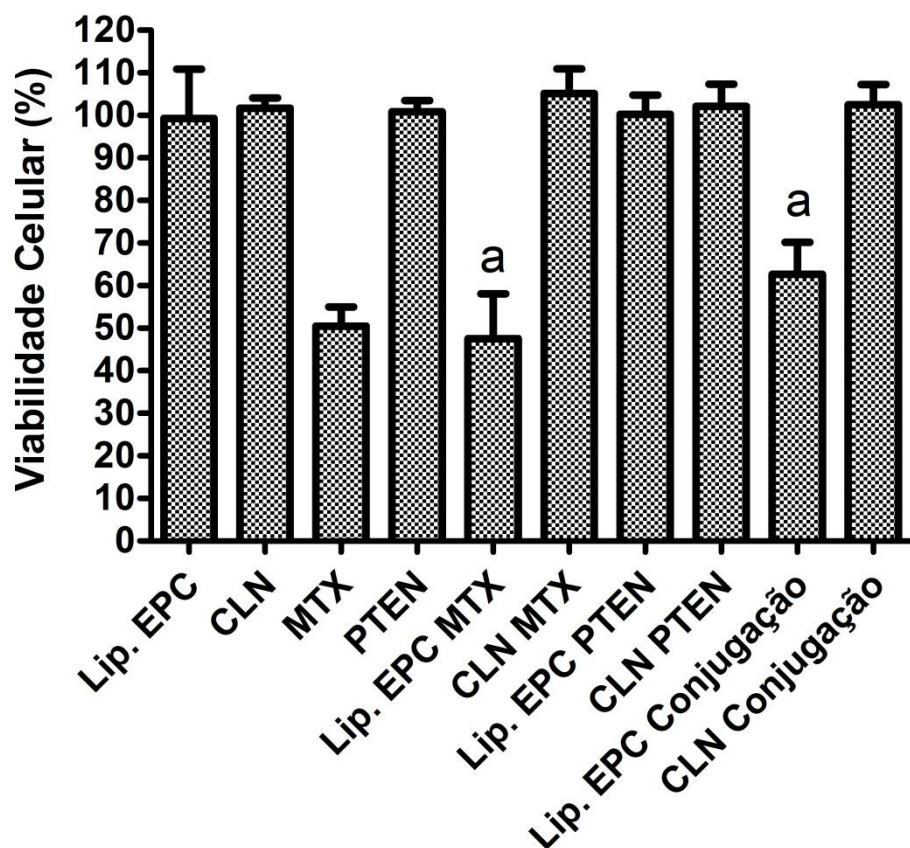


Figura 24 - Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de fibroblastos embriônicos de camundongo (Balb/3T3) testados por 24h com lipossomas de EPC vazios (Lip. EPC); CLN vazia (CLN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em lipossomas de EPC (Lip. EPC MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em CLN (CLN MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em lipossomas de EPC (Lip. EPC PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em CLN (CLN PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em lipossomas de EPC (Lip. EPC Conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em CLN (CLN Conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ). “a” representa diferença estatística ( $p<0,05$ ) em comparação com lipossomas de EPC vazios (Lip. EPC); Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.

Na Figura 25 apresentamos os resultados de citotoxicidade de lipossomas de DOTAP e NLS em células de câncer de próstata PC3. O tratamento com mitoxantrona

livre diminuiu a viabilidade das células de câncer de próstata para 48,4 %, demonstrando a susceptibilidade desta linhagem ao fármaco. As formulações lipossomais de DOTAP com MTX apresentaram toxicidade similar (42,9 % de viabilidade celular) para esta linhagem. Entretanto, não observamos toxicidade significativa para a formulação de MTX encapsulada em NLS.

As formulações lipossomais de DOTAP contendo o gene para PTEN causaram uma diminuição na viabilidade celular em níveis similares àqueles obtidos com a sua conjugação com MTX, e ambos foram mais citotóxicos que o tratamento com plasmídeo sozinho. Já para a formulação de NLS, os níveis de toxicidade do gene PTEN foram significativos, e similares aos obtidos com a conjugação gene e fármaco. Além disso, a citotoxicidade induzida pelas NLS contendo o gene da PTEN e mitoxantrona nas células PC3 foi maior que a causada pelos lipossomas contendo ambos os ativos (lipossoma de DOTAP conjugado) ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 26, observamos a viabilidade celular na presença de formulações de lipossomas de EPC e CLN para linhagem PC3. Os carreadores não apresentaram toxicidade, enquanto que o fármaco MTX reduziu a viabilidade celular (48,6 %). Níveis similares de toxicidade foram registrados após tratamento das células com lipossomas de EPC contendo MTX, como observado também para as células não cancerígenas (Figura 24). Por não possuírem potencial Zeta positivo suficiente para interagir com material genético em sua superfície, como demonstrado pela Figura 20, tanto o lipossomas de EPC quanto as CLN não demonstraram níveis significativos de citotoxicidade com o gene da PTEN. Para a citotoxicidade induzida pela MTX, a formulação com CLN não apresentou níveis significativos. Neste caso, como na linhagem Balb/3T3, é possível que o fármaco não tenha sido liberado desta partícula, também.

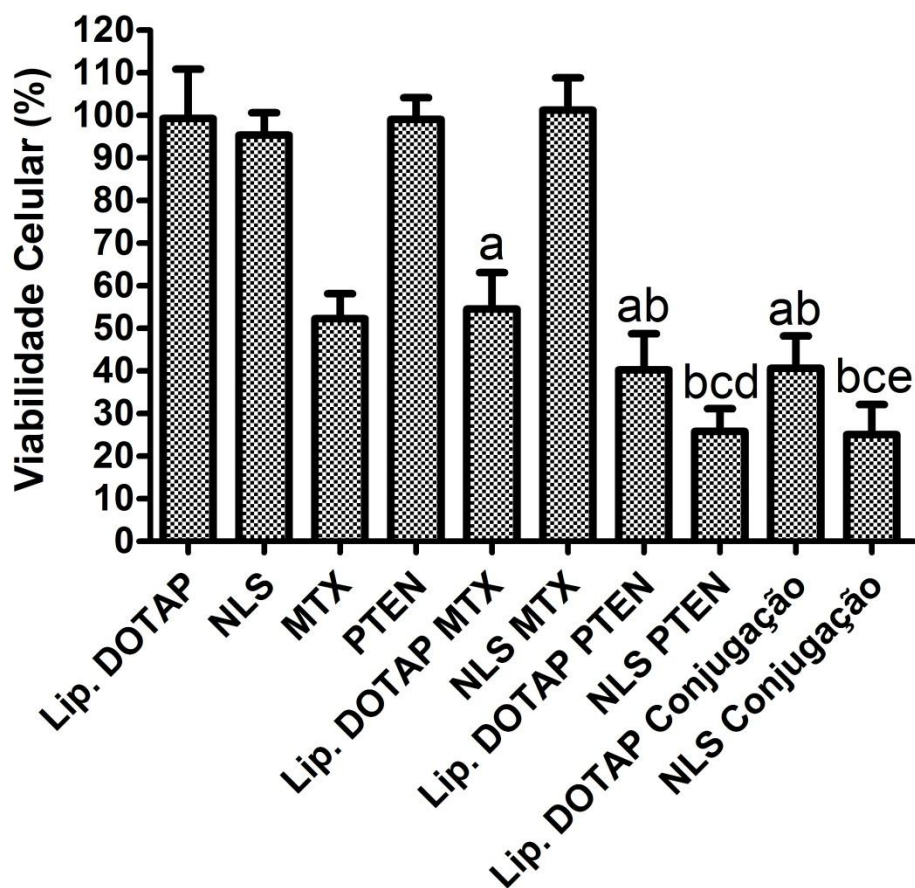


Figura 25 - Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de Carcinoma de Próstata (PC3) tratadas por 24h com lipossomas de DOTAP vazios (Lip. DOTAP); NLS vazia (NLS);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em NLS (NLS MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em Lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em NLS (NLS PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP Conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em NLS (NLS Conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ). “a” representa diferença estatística ( $p<0,05$ ) em comparação com lipossomas de DOTAP vazios (Lip. DOTAP); “b” como diferença estatística em relação ao plasmídeo de PTEN livre (PTEN); “c” como diferença estatística em relação à NLS vazia; “d” como diferença estatística com mitoxantrona carregada por lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP MTX); “e” como a diferença estatística em relação ao carregamento



conjunto por lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP conjugação). Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.

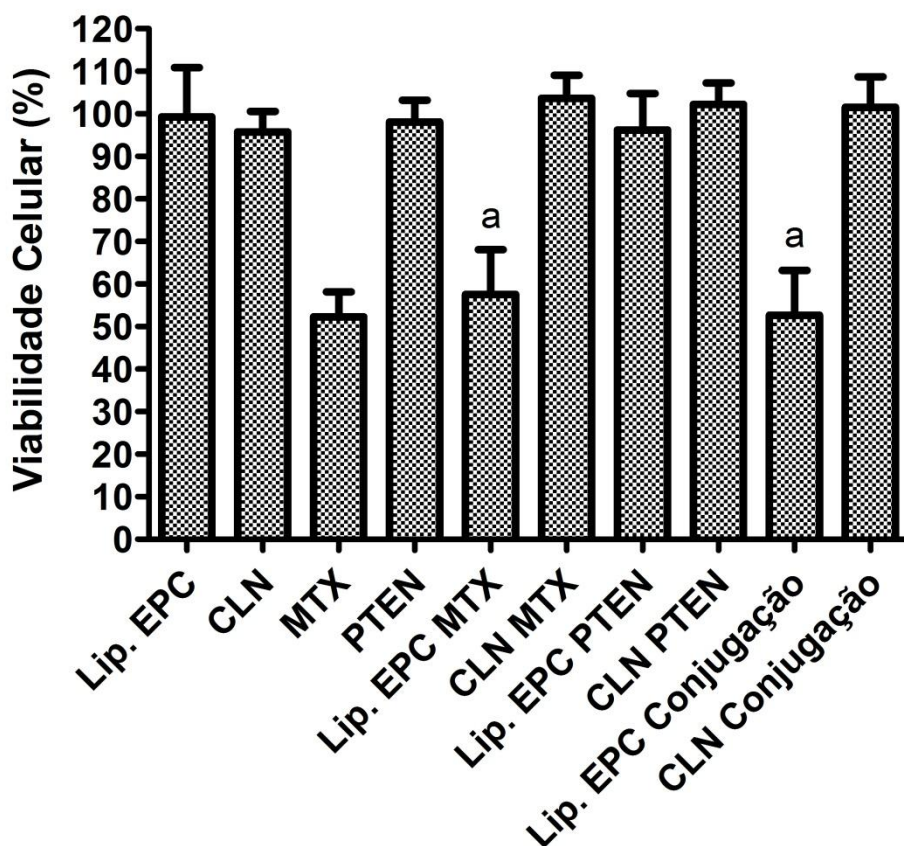


Figura 26 - Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de carcinoma de próstata (PC3) tratadas por 24h com lipossomas de EPC vazios (Lip. EPC); CLN vazia (CLN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulado em lipossomas de EPC (Lip. EPC MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em CLN (CLN MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em Lipossomas de EPC (Lip. EPC PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em CLN (CLN PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em lipossomas de EPC (Lip. EPC Conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em CLN (CLN Conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ). “a” representa diferença estatística ( $p<0,05$ ) em comparação com lipossomas de EPC vazios (Lip. EPC). Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.

Como último passo de nossa análise, avaliamos a citotoxicidade dos carreadores produzidos (lipossomas, CLN e NLS) em outra linhagem cancerígena, a de câncer de mama resistente à mitoxantrona (MCF-7). Os resultados obtidos estão expostos na Figura 27 - para Lipossomas de DOTAP e NLS - e Figura 28 - para lipossomas de EPC e CLN.

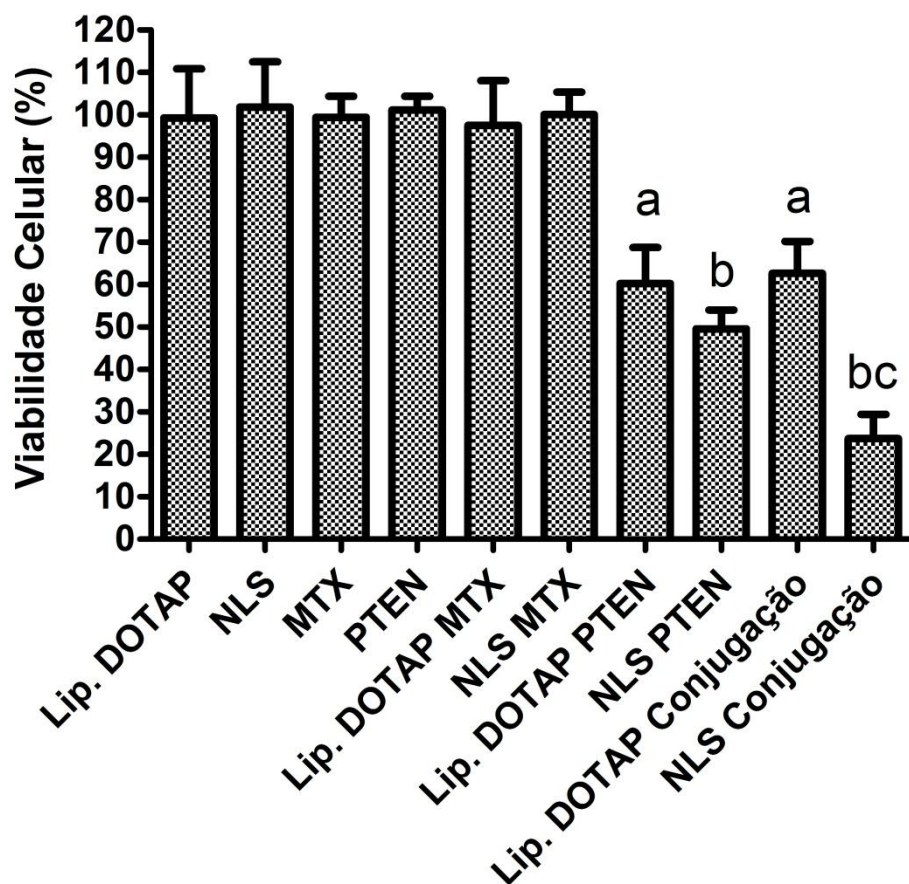
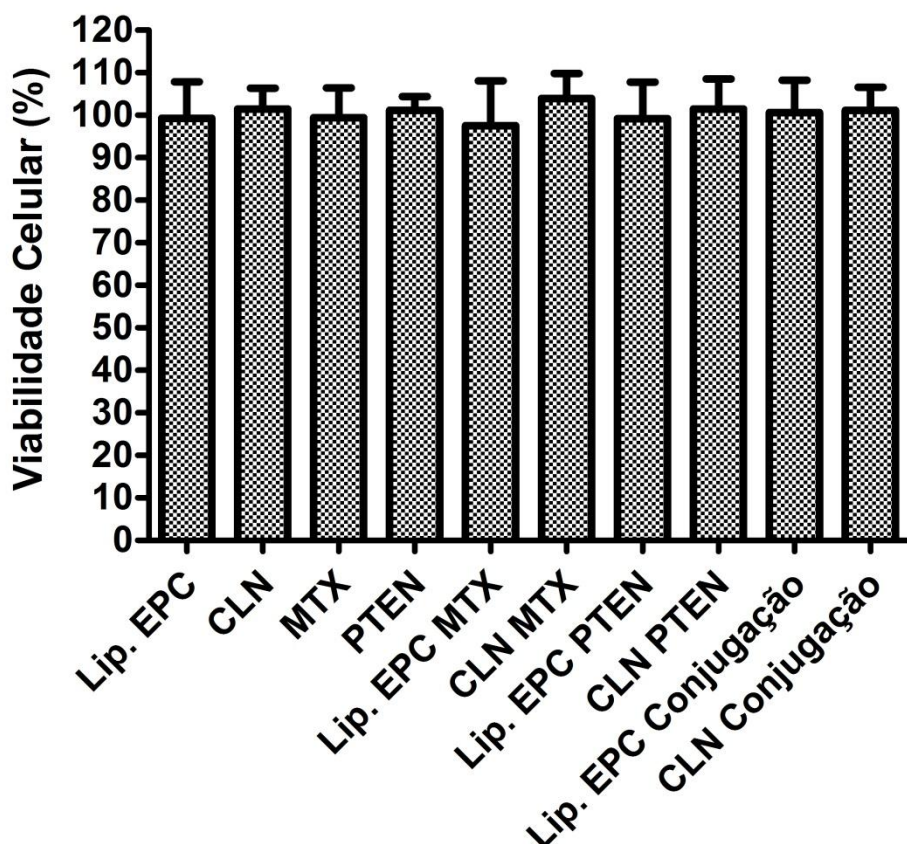


Figura 27 - Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de Câncer de Mama (MCF-7 resistente) tratadas por 24h com lipossomas de DOTAP vazios (Lip. DOTAP); NLS vazia (NLS);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulado em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em NLS (NLS MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em NLS (NLS PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em Lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de

*PTEN em NLS (NLS conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3). “a” representa diferença estatística (p<0,05) em comparação com lipossomas de DOTAP vazio (Lip. DOTAP) e PTEN Livre; “b” como diferença estatística em relação à NLS vazia e PTEN livre; “c” como diferença estatística com PTEN carregada por NLS (NLS PTEN) e carregamento conjunto por Lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP conjugação). Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.*



*Figura 28 - Viabilidade acessada por MTT de  $10^3$  células por poço de Câncer de Mama (MCF-7 resistente) tratadas por 24h com lipossomas de EPC vazia (Lip. EPC); CLN vazia (CLN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona livre (MTX); plasmídeo de PTEN livre (PTEN);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulado em lipossomas de EPC (Lip. EPC MTX);  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mitoxantrona encapsulada em CLN (CLN MTX); Plasmídeo de PTEN encapsulado em lipossomas de EPC (Lip. EPC PTEN); Plasmídeo de PTEN encapsulado em CLN (CLN PTEN); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em Lipossomas de EPC (Lip.*

*EPC conjugação); encapsulação conjunta de mitoxantrona e plasmídeo de PTEN em CLN (CLN conjugação). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3). Análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey.*

Para o câncer de mama (MCF-7), observamos que a linhagem se mostrou resistente ao fármaco livre (MTX) e encapsulado em lipossomas de DOTAP (Lip. DOTAP MTX) ou nas NLS (NLS MTX) (Figura 27). O tratamento com o gene codificante de PTEN induziu toxicidade, tanto com os lipossomas de DOTAP com as NLS, demonstrando que o carregamento genético pode ser realizado por estes dois carreadores. Além disso, registrou-se um efeito sinérgico na formulação de carregamento conjunto do fármaco MTX e do gene codificante de PTEN pelas NLS, levando a maior perda de viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). A liberação de MTX não pôde ser visualizada no carregamento somente de MTX pelas NLS (Figura 27) provavelmente devido à resistência ao fármaco da MCF-7, como demonstrado na Figura 22, algo que só pode ser demonstrado com a expressão de PTEN (Conjugação NLS). Zhang e col. (2004) obtiveram resultados semelhantes com a conjugação de mitoxantrona e flavonóides, revertendo, assim, a resistência ao fármaco em células MCF-7.

Esta sinergia pode ter sido causada pela expressão da PTEN em conjunto com liberação da MTX das NLS para as células de MCF-7. Esta liberação de MTX não ocorreu nas células PC3, o que pode demonstrar a importância do mecanismo de internalização e o subsequente processamento intracelular de nanopartículas, demonstrando que esse fenômeno é célula-dependente, já que demonstramos não haver um efeito de expulsão repentina (*burst effect*) da droga até 72 horas (Figura 19). Possivelmente, a internalização das partículas e consequente processamento intracelular sejam distintos nos 2 tipos de células cancerígenas testadas. Com a MCF-7, há algum processamento da NLS que libera a MTX, pois, para 24 horas de exposição com a NLS, demonstramos haver liberação de apenas 5,8 % da mitoxantrona encontrada na NLS (Figura 19), enquanto que nas células PC3 há degradação das partículas, ou ainda, não há liberação da MTX (Sahay et al, 2010).

Já para CLN e lipossomas de EPC, não foram observados efeitos citotóxicos nas concentrações testadas, nem pelo MTX, nem pelo gene da PTEN, sobre as células

MCF-7 (Figura 28). Isso demonstra que a linhagem celular é resistente a esta concentração de fármaco, mesmo carregado (no caso do lipossoma de EPC) ou que a MTX não foi liberada das CLN, não ocasionando efeito tóxico. Em relação ao carregamento genético e a possibilidade de efeito sinérgico entre MTX e gene da PTEN, não houve efeito citotóxico nessas células. Isso demonstra que o carregamento genético se faz necessário, já que as CLN não possuem ligação específica com o material genético e não foram efetivas, enquanto o carregamento genético obtido nas NLS foi fator determinante para a o sucesso obtido, na diminuição da viabilidade celular nesta esta linhagem resistente à MTX (Figura 27).

Em suma, pudemos ver que a sinergia (MTX e gene da PTEN) é benéfica neste caso, onde possivelmente o gene para a proteína PTEN fragilize as células resistentes, possibilitando a atuação do fármaco mais eficientemente, matando as células cancerígenas (MCF-7), diferentemente dos resultados observados com células não cancerígenas (Balb/3T3, Figura 24).

Em todas as linhagens analisadas, o DNA codificante para PTEN não induziu níveis significativos de perda de atividade celular, reiterando a interpretação de não haver internalização significativa do material genético livre, o que está de acordo com relatos da literatura, em que nem com altas doses de DNA codificante para eGFP e LacZ foi possível diminuir significativamente a viabilidade celular em células de HEK293 (Liu *et al.*, 2007).

## 5. Conclusões

Com tudo isto, podemos concluir para as metas estabelecidas:

1) a extrusão de microemulsão pode produzir nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), demonstrando toda sua versatilidade e otimizamos a metodologia para o preparo dessas nanopartículas lipídicas com 15 passagens pela membrana e temperatura do sistema como a temperatura de fusão do lipídio sólido acrescido de 5 °C ( $T_f+5^\circ\text{C}$ ). Esta metodologia é uma alternativa para métodos de produção atuais, e.g., homogeneização à alta pressão e microemulsão à quente, principalmente para formulações preparadas em pequenos

volumes, escala laboratorial ou que contêm compostos caros ou difíceis de obter, como fármacos, lipídios catiônicos, moléculas usadas para endereçamento (*targeting*) da formulação, marcadores de fluorescência, entre outros. Além disso, a extrusão em pequenos volumes é uma técnica rápida, barata, reprodutiva e que não utiliza solventes orgânicos.

2) As CLN e NLS se apresentaram estáveis ao longo de 180 dias sob refrigeração (4 °C), ao contrário dos lipossomas de EPC e DOTAP que foram estáveis por somente 90 dias. As micrografias demonstraram ultraestrutura monolítica nas nanopartículas lipídicas (CLN e NLS), enquanto que a calorimetria mostra transições endotérmicas residuais de seus lipídios sólidos, o que pode diferenciar tais partículas dos lipossomas, que apresentaram grande fração aquosa na microscopia eletrônica de transmissão e nenhuma transição.

3) Para o carregamento de fármacos, ambas nanopartículas (CLN e NLS) foram capazes de incorporar eficientemente (81 e 64 %, respectivamente) o quimioterápico mitoxantrona, enquanto que lipossomas de formulação similar (EPC e DOTAP, respectivamente) apresentaram encapsulação abaixo de 20 %. A cinética de liberação do fármaco foi diferente também, sendo que, nos lipossomas, a permeação de toda mitoxantrona ocorreu em 8 horas (tempo similar ao do fármaco livre), enquanto que apenas 12 % da MTX foram permeadas após 72 horas de ensaio, nas formulações de CLN e NLS.

4) Para o carregamento de genes, apenas os carreadores catiônicos (NLS e lipossomas de DOTAP) foram capazes de interagir com material genético (DNAP) de forma eficiente e o protegeram contra a enzima degradadora de DNA (DNase I) de forma similar, enquanto que os carreadores neutros (CLN e lipossomas de EPC) não apresentaram tal capacidade. Isto foi devido à diferença entre o potencial Zeta dessas partículas.

5) As NLS e os lipossomas de DOTAP contendo o gene codificante para PTEN induziram citotoxicidade em câncer de próstata (PC3). O carregamento concomitante do fármaco mitoxantrona e do gene codificante para PTEN nas NLS induziu perda de atividade celular em linhagem de câncer de mama (MCF-7 resistente), demonstrando

um efeito sinérgico na ação desses agentes anticancerígenos *in vitro*. Assim, a terapia combinada, com genes e fármacos carregados em sistemas de liberação sustentada, pode ser uma interessante alternativa para o tratamento mais eficiente contra o câncer.

## **6. Perspectivas**

Em sequência deste trabalho, pretendemos elucidar o(s) mecanismo(s) que as faz(em) eficientes em um tipo celular (MCF-7 resistente, PC3) e não em outro (Balb/3T3). Provavelmente, diferentes mecanismos de internalização e o tráfego intracelular dessas nanopartículas possam explicar as diferenças apresentadas.

Propomos, também, realizar análises com microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das NLS com o fármaco (mitoxantrona) e gene codificante para PTEN encapsulado, comparando-as com as imagens obtidas com os carreadores vazios e verificar o efeito da liofilização das partículas carregadas com o fármaco nos ensaios de diálise, para avaliar se não há liberação antecipada de mitoxantrona frente à liofilização dos veículos. Assim como avaliar a estabilidade físico-química das formulações à temperatura e umidade relativa ambiente ao longo do tempo.

Elegemos, também, a realização do tratamento com mitoxantrona e gene para PTEN das células de câncer de mama e de próstata por 48 e 72 horas, juntamente com a realização de western blotting como forma de demonstrar que o gene para PTEN é realmente expresso nas linhagens celulares.

Por fim, propomos estudar a funcionalização da superfície das partículas com polietileno glicol (PEG) e/ou moléculas para direcionamento tecidual e testar se estas modificações realmente podem aumentar a especificidade das partículas para serem tecido-específicas, uma vez na corrente sanguínea.

## 7. Referências Bibliográficas

ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L.K.; FAROKHZAD, O.C., Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.*, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008a.

ALEXIS, F.; RHEE, J.W.; RICHIE, J.P.; RADOVIC-MORENO, A.F.; ROBERT LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C., New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.*, v. 26, p. 74-85, 2008b.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P.J.; COFFEY, J.; JOHNSON, N., Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionization mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin. *Rapid. Commun. Mass SP.*, v. 16, n. 10, p. 933-935, 2002.

ALLISON, S. D.; MOLINA, M. D. C.; ANCHORDOQUY, T. J., Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, v. 1468, n. 1-2, p. 127-138, 2000.

ALMOND, B. A.; HADBAA, A. R.; FREEMANA, S. T.; CUEVASA, B.J.; YORKA, A. M.; DETRISACB, C. J.; GOLDBERGA, E. P., Efficacy of mitoxantrone-loaded albumin microspheres for intratumoral chemotherapy of breast cancer. *J. Contr. Rel.*, v. 91, p. 147-155, 2003.

ANAI, S. GOODISON, S.; SHIVERICK, K.; ICZKOWSKI, K.; TANAKA, M.; ROSSER, C.J., Combination of PTEN Gene Therapy and Radiation Inhibits the Growth of Human Prostate Cancer Xenografts. *Hum. Gene Ther.*, v. 17, n. 10, p. 975-984, 2006.

ANNA, R.S., Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 59, n. 6, p. 411-418, 2007.

BANGHAM, A. D., Liposomes: realizing their promise. *Hosp. Pract.*, v. 27, p. 51-6, 1992.

BARTHOLOMEUSZ, C. & GONZALEZ-ANGULO, A. M., Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targ.*, v. 16, n. 1, p. 121-130, 2012.

BEXELL, D.; SCHEDING, S.; BENGZON, J., Toward Brain Tumor Gene Therapy Using Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Vectors. *Mol. Ther.*, v. 18, n. 6, p. 1067-1075, 2010.

BLAESE, M.; BLANKENSTEIN, T.; BRENNER, M. K.; COHEN-HAGUENAUER, O.; GANSBACHER, B.; RUSSELL, S.; SORRENTINO, B.; VELU, T., Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.*, v. 2, n. 4, p. 291-297, 1995.



BOCHOT, A. & FATTAL, E., Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *J. Control. Release*, v.161, n.2, p.628-634, 2012.

BRENNER, M. K., Cellular therapy for cancer: Let there be light. *Tissue Antigens*, v. 79, n. 1, p. 1-3, 2012.

BUDAVARI, S. *The Merck Index*, 12<sup>a</sup> edição, Whitehouse Station, Nova Jersey, p. 1064, 1996.

BUNJES, H.; STEINIGER, F.; RICHTER, W., Visualizing the Structure of Triglyceride Nanoparticles in Different Crystal Modifications. *Langmuir*, v. 23, n. 7, p. 4005-4011, 2007.

BURNS, C.P.; HAUGSTAD, B.N.; NORTH, J.A., Membrane transport of mitoxantrone by L1210 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, v.36, n.6, p.857-860, 1987

CABRAL, E. C. M.; ZOLLNER, R. L.; SANTANA, M. H. A., Preparation and Characterization of Liposomes entrapping Allergenic Proteins. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 21, n. 2, p. 137 - 146, 2004.

CARBONE, C.; TOMASELLO, B.; RUOZI, B.; RENIS, M.; PUGLISI, G., Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 49, n. 0, p. 110-117, 2012.

CASUCCI, M.; BONDANZA, A.; FALCONE, L.; PROVASI, E.; MAGNANI, Z.; BONINI, C., Genetic engineering of T cells for the immunotherapy of hematological malignancies. *Tissue Antigens*, v. 79, n. 1, p. 4-14, 2012.

CHARCOSSET, C.; EL-HARATI, A.; FESSI, H., Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Contr. Rel.*, v. 108, p. 112-120, 2005.

CHARCOSSET, C.; EL-HARATI, A. A.; FESSI, H., A membrane contactor for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Desalination*, v. 200, p. 570-571, 2006.

CHEN, C., HAN, D.; CAI, C.; TANG, X., An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J. Control. Release*, v. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CHEN, D.B.; YANG, T.Z.; LU, W.L.; ZHANG, Q., In Vitro and in Vivo Study of Two Types of Long-Circulating Solid Lipid Nanoparticles Containing Paclitaxel. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 49, n. 11, p. 1444-1447, 2001.

CHENEY, I. W.; JOHNSON, D.E.; VAILLANCOURT, M.T.; AVANZINI, J.; MORIMOTO, A.; DEMERS, G. W.; WILLS, K.N.; SHABRAM, P.W.; BOLEN, J.B.; TAVTIGIAN, S.V.; BOOKSTEIN, R., Suppression of Tumorigenicity of Glioblastoma Cells by Adenovirus-mediated MMAC1/PTEN Gene Transfer. *Cancer Res.*, v. 58, n. 11, p. 2331-2334, 1998.

- CHUNG, E. J.; LEE, H.K.; JUNG, S.-A.; LEE, S.J.; CHEE, H.Y.; SOHN, Y.H.; LEE, J.H., Transduction of PTEN Proteins Using the Tat Domain Modulates TGF- $\beta$ 1-Mediated Signaling Pathways and Transdifferentiation in Subconjunctival Fibroblasts. *Invest. Ophth. Vis. Sci.*, v. 53, n. 1, p. 379-386, 2012
- COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F., Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 41, p. 2-13, 1995.
- DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N., Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release*, v. 117, p. 163-170, 2007.
- DE JESUS, M. B., Utilização de ferramentas nanotecnológicas para a indução de morte em células de câncer de próstata. 2009. Tese (doutorado em Biologia funcional e molecular, ênfase bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade de Campinas. Campinas.
- DEL POZO-RODRIGUES, A.; DELGADO, D.; SOLINIS, M.A.; GASCÓN, A.R.; PEDRAZ, J.L., Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int. J. Pharm.*, v. 339, p. 261-268, 2007.
- DEL POZO-RODRIGUEZ, A.; SOLINÍZ, M.A.; GASCÓN, A.R.; PEDRAZ, J.L., Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, p. 181–189, 2009.
- DEMEURE, M. J.; STEPHAN, E.; SINARI, S.; MOUNT, D.; GATELY, S.; GONZALES, P.; HOSTETTER, G.; KOMOROWSKI, R.; KIEFER, J.; GRANT, C.S.; HAN, H.; VON HOFF, D. D.; BUSSEY, K.J., Preclinical Investigation of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel as a Potential Treatment for Adrenocortical Cancer. *Ann. Surg.*, v. 255, n. 1, p. 140-146, 2012.
- DENIZOT, F.; LANG, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* v. 89, p. 271-277, 1986.
- EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J. Gene Med.*, v. 9, p. 833-842, 2007.
- ELOUAHABI, A. & RUYSSCHAERT, J. M., Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol. Ther.*, v. 11, p. 336–347, 2005.
- ETTL, T.; BAADER, K.; STIEGLER, C. ; MULLER, M.; AGAIMY, A.; ZENK, J.; KUHNEL, T.; GOSAU, M.; ZEITLER, K.; SCHWARZ, S.; BROCKHOFF, G., Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer. *Br. J. Biol.*, 2012.
- FASSAS, A. & ANAGNOSTOPOULOS, A., The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma*, v. 46, p. 795-802, 2005.

FELGNER, P. L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H.W.; WENZ, M.; ORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M., Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 7413–7417, 1987.

FENG, F.; ZHENG, D.; DUAN, C.; WANG, Y.; JIA, L.; WANG, F.; LIU, Y.; GAO, Q.; ZHANG, Q., Preparation, characterization and biodistribution of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of bifendate. *J. Microencapsul.*, v. 28, n. 4, p. 280-285, 2011.

GASCO, M. R., Lipid Nanoparticles: Perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 59, p. 377-378, 2007.

GASSMAN, O.; REEPMAYER, G.; ZEDTWITZ, M. V., *Leading Pharmaceutical Innovation: Trends and Drivers 2a*. Springer-Verlag, Berlin, 2008.

GIACOMINI, K. M. & SUGIYAMA, Y., Chapter 2 - Membrane transporters In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., (Ed.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11a: McGraw-Hill, New York, 2006. cap. 15,

GOODIN, D. S.; ARNASON, B.G.; COYLE, P.K.; FROHMAN, E.M.; PATY, D.W., The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis. *Neurology*, v. 61, n. 10, p. 1332-1338, 2003.

GROBAS S., MENDEZ J., LOPEZ C. B., De BLAS C., MATEOS G.G., Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk  $\alpha$ -tocopherol concentration. *Poult Sci*, v.81 p.376–381, 2002

HAHN, T.; POLANCZYK, M.J.; BORODOVSKY, A.; RAMANATHAPURAM, L.V.; AKPORIAEYE, E.T., Use of anti-cancer drugs, mitocans, to enhance the immune responses against tumors. *Curr. Pharm. Biotech.*, v. in press, 2012.

HINRICHS, W. L. J.; PRINSEN, M. G.; FRIJLINK, H. W., Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *Int. J. Pharm.*, v. 215, n. 1–2, p. 163-174, 2001.

HOU, D. Z.; XIE, C.S.; HUANG, K.; ZHU, C.H., The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, v. 24, n. 10, p. 1781-1785, 2003.

HOU, D. Z.; XIE, C.S.; YANG, X.L.; XU, H.B.; PING, Q.N., Microstructure of novel solid lipid nanoparticle loaded triptolide. *Acta Pharmaceut.* v. 42, n. 2, p. 429-433, 2007.

IGNEY, F.H. & KRAMMER, P.H., Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat. Rev. Cancer*, v. 2, p.277-288, 2002.

IMMORDINO, M.L.; DOSIO, F.; CATTEL, L., Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical application, existing and potential, *Int. J. Nanomed.*, v.1 n.3, p.297-315, 2006.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D., Global Cancer Statistics. *CA-Cancer J. Clin.*, v. 61, p. 69–90, 2011.

JOSHI, M. D. & MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, n. 2, p. 161-172, 2009.

KARNIK, R.; GU, F.; BASTO, P.; CANNIZZARO, C.; DEAN, L.; KYEI-MANU, W.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C., Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nano Letters*, v. 8, n. 9, p. 2906-2912, 2008.

KINGSLEY, J. D.; DOU, H.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H.E.; DESTACHE, C.J., Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *J.Neuroimmune Pharm.*, v. 1, p. 340-350, 2006.

KOO, C. Y.; SEN, Y.P.; BAY, B.H.; YIP, G.W., Targeting heparan sulfate proteoglycans in breast cancer treatment. *Recent Pat. Anti-canc.*, v. 3, p. 151-158, 2008.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H., Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*, v. 26, p. 193-212, 2005.

KUMAR, W.; CHANDRASEKER, D.; RAMAKRISHNA, S.; KISHAN, V.; RAO, Y.M.; DIWAN, P.V., Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *Int. J. Pharm.*, v. 335, p. 167-175, 2007.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J.C.; BUNJES, H., Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int J Pharm.*, v 417, p. 120–137, 2011.

LI, N.; MA, Y.; YANG, C.; GUO, L.; YANG, X., Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophys. Chem.*, v. 116, p. 199-205, 2005.

LI, S. & HUANG, L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.*, v. 7, p. 31-34, 2000.

LI, S.; ZHAO, B.; WANG, F.; WANG, M.; XIE, S.; WANG, S.; HAN, C.; ZHU, L.; ZHOU, W., Yak interferon-alpha loaded solid lipid nanoparticles for controlled release. *Res. Vet. Sci.*, v. 88, n. 1, p. 148-153, 2010.

LIM, H. J.; MASIN, D.; MADDEN, T.D.; BALLY, M.B., Influence of Drug Release Characteristics on the Therapeutic Activity of Liposomal Mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 281, n. 1, p. 566-573, 1997.

LITMAN, T.; BRANGI, M.; HUDSON, E.; FETSCH, P.; ABATI, A.; ROSS, D.D.; MIYAKE, K.; RESAU, J.H.; BATES, S.E., The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.*, v. 113, p. 2011-2021, 2000.

LIU, F.; CHEN, Z.; WANG, J.; SHAO, X.; CUI, Z.; YANG, C.; ZHU, Z.; XIONG, D., Overexpression of Cell Surface Cytokeratin 8 in Multidrug-Resistant MCF-7/MX Cells Enhances Cell Adhesion to the Extracellular Matrix. *Neoplasia*, v. 11, p. 1275–1284, 2008.

LIU, G; SWIERCZEWSKA, M.; LEE, S.; CHEN, X., Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery. *Nano Today*, v. 5, p. 524-539, 2010.

LIU, Z.; ZHONG, Z.; PENG, G.; WANG, S.; DU, X.; YAN, D.; ZHANG, Z.; HE, Q.; LIU, J., Folate receptor mediated intracellular gene delivery using the charge changing solid lipid nanoparticles. *Drug Deliv.*, v. 16, n. 6, p. 341-347, 2009.

LU, B.; XIONG, S.B.; YANG, H.; YIN, X.D.; CHAO, R.B., Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 28, n. 1–2, p. 86-95, 2006.

LUK, S. YAP, W.N.; CHIU, Y.T.; LEE, D.T.; MA, S.; LEE, T.K.; VASIREDDY, R.S.; WONG, Y.C.; CHING, Y.P.; NELSON, C.; YAP, Y.L.; LING, M.T., Gamma-tocotrienol as an effective agent in targeting prostate cancer stem cell-like population. *Int. J. Cancer*, 2010.

MA, Y.; NOLTE, R. J. M.; CORNELISSEN, J. J. L. M., Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.64, n.9, p.811-825, 2012.

MACDONALD, P., Chemotherapeutic Drugs Emergencies in Pediatric Oncology. In: SCHEINEMANN, K. e BOYCE, A. E. E. (Ed.): Springer New York, 2012. p.105-120

MAHONEY, B.P.; RAGHUNAND, N.; BAGGETT, B.; GILLIES, R.J., Tumor acidity, ion trapping, and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, v.66, p.1207-1218, 2003.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; FERREIRA, D.C.; SOUTO, E.B., Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, v. 2, n. 4, p. 595–607, 2007.

MCNEISH, I. A.; BELL, S. J.; LEMOINE, N. R., Gene Therapy Progress and Prospects: cancer gene therapy using tumor suppressor genes. *Gene Ther.*, v. 11, p. 497-503, 2004.

MEHNERT, W. & MÄDER, W., Solid Lipid Nanoparticles: Production, characterization and application. *Drug Deliv.*, v. 47, p. 165-196, 2001.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S., Colloidal Nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomed.-Nanotech.*, v. 6, p. 9-24, 2010.

MOLINA, M. D. C.; ARMSTRONG, T. K.; ZHANG, Y.; PATEL, M.M.; LENTZ, Y.K.; ANCHORDOQUY, T.J., The Stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage. *J. Pharm. Sci.*, v. 93, n. 9, p. 2259-2273, 2004.

MORANO, J. K.; MARTIN, F. J.; WOODLE, M., Liposome Extrusion Method. *Int.Cl.*<sup>A61K9/127</sup>. EUA. PI 4927637. 22 maio 1990. Liposome Technology, Inc. p.10.

MUI, B.; CHOW, L.; HOPE, M. J., Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. *Meth. Enzymol.*, v. 367, p.3-14, 2003.

MÜLLER, R. H. & HEINEMANN, S., Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. *Clin.Nutr.*, v. 11, n. 4, p. 223–236, 1992.

MÜLLER, R. H.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S., Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 41, p. 62-69, 1995

MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 50, p. 161–177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. 131-155, 2002.

MULROY, E.; JOYCE, E.; SCOTT, J.; MELLING, J.; GOGGIN, C.; MAHON, N.; O'ROURKE, K.; LYNCH, T., Long-Term Risk of Leukemia or Cardiomyopathy after Mitoxantrone Therapy for Multiple Sclerosis. *Eur. Neurol.*, v. 67, n. 1, p. 45-47, 2012.

MUNARO, M., Desenvolvimento de blendas de polietileno com desempenho aperfeiçoado para utilização no setor elétrico. 2007. Tese (Doutorado em engenharia e ciências dos materiais). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NAYAK, A.P.; TIYABOONCHAI, W.; PATANKAR, S.; MADHUSUSHAN, B.; SOUTO, E.B., curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment, *Colloid. Surface B*, v.81, n.1, p. 263-273, 2010.

NIIDOME, T. & HUANG, L., Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.*, v. 9, n. 24, p. 1647-52, 2002

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.M.; MULLER, R.M.; KNEUER, C., Cationic solid– lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release*, v. 77, p. 345–355, 2001.

OLSON, F.; HUNT, C. A.; SZOKA, F. C.; VAIL, W. J.; PAPAHAADJOPOULOS, D., Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979.

PARK, J. H.; SARAVANAKUMARA, G.; KIMB, K.; KWON, I.C., Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 62, p. 28-41, 2010.

PARVEEN, S. & SAHOO, S. K., Polymeric nanoparticles for cancer therapy, *J. Drug Target.*, v. 16, n. 2, p. 108-123, 2008.

PATHAK, P. & NAGARSENKER, M., Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 10, n. 3, p. 985-992, 2009.

RAGHUNAND, N.; MAHONEY, B.P.; GILLIES, R.J., Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents, *Biochem. Pharmacol.*, v.66, p.1219-1229, 2003.

RAGUZ, S. & YAGÜE, E., Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *Brit. J. Cancer.*, v. 99, p. 387–391, 2008.

RAMEEZ, S.; BAMBA, I.; PALMER, A. F., Large Scale Production of Vesicles by Hollow Fiber Extrusion: A Novel Method for Generating Polymersome Encapsulated Hemoglobin Dispersions. *Langmuir*, v. 26, n. 7, p. 5279-5285, 2009.

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

REJMAN, J.; BRAGONZI, A.; CONESE, M., Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.*, v. 12, p. 468–474, 2005.

ROTH, J. A. & CRISTIANO, R. J., Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going? *J. Natl. Cancer I. Monogr.*, v. 89, n. 1, p. 21-39, 1997.

SAHOO, S. K. & LABHASETWAR, V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today*, v. 8, p. 1112-1120, 2003.

SAITO, Y.; SWANSON, X.; MHASHILKAR, A.M.; OIDA, Y.; SCHROCK, R.; BRANCH, C.D.; CHADA, S.; ZUMSTEIN, L.; RAMESH, R., Adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene inhibits human colorectal cancer growth in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, v. 10, p. 1961–1969, 2003.

SATO, T.; NEILSON, L.M.; PECK, A.R.; LIU, C.; TRAN, T.H.; WITKIEWICZ, A.; HYSLOP, T.; NEVALAINEN, M.T.; SAUTER, G.; RUI, H., Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 3, p. 347–355, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHNEIDER, K. A., *Counseling about cancer: Strategies for genetics counseling*. 3a Wiley-Blackwell, New Jersey, 2012. 480p.

SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S., ELICEIRI, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9, 671-675, 2012.

SHER, Y.P.; LIU, S.J.; CHANG, C.M.; LIEN, S.P.; CHEN, C.H.; HAN, Z.; LI, L.Y.; CHEN, J.S.; WU, C.W.; HUNG, M.C., Cancer-Targeted BikDD Gene Therapy Elicits Protective Antitumor Immunity against Lung Cancer. *Mol. Cancer Ther.*, v. 10, n. 4, p. 637-647, 2011.

SHERIDAN, C., Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol.*, v. 29, n. 2, p. 121-128, 2011.

SHOOK, D. R. & CAMPANA, D., Natural killer cell engineering for cellular therapy of cancer. *Tissue Antigens*, v. 78, n. 6, p. 409-415, 2011.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A., Cancer Statistics, 2012, *CA-Cancer J. Clin.*, vol.62, p.10-29, 2012.

SILVA, A. C.; GONZALÉZ-MIRA, E.; GARCIA, M.L.; EGEA, M.A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E.B., Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) : High pressure versus ultrasound. *Colloid. Surface B*, v. 83, p. 158-165, 2011.

SIMONELLI, F.; MAGUIRE, A.M.; TESTA, F.; PIERCE, E. A.; MINGOZZI, F.; BENNICELLI, J.L.; ROSSI, S.; MARSHALL, K.; BANFI, S.; SURACE, E. M.; SUN, J.; REDMOND, T. M.; ZHU, X.; SHINDLER, K.S.; YING, G.S.; ZIVIELLO, C.; ACERRA, C.; WRIGHT, J. F.; MCDONNELL, J.; HIGH, K. A.; BENNETT, J.; AURICCHIO, A., Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol. Ther.*, v. 18, n. 3, p. 643-650, 2010.



SOOD, A.; MCCLAIN, D.; MAITRA, R.; BASU-MALLICK, A.; SEETHARAM, R.; KAUBISCH, A.; RAJDEV, L.; MARIADASON, J.M.; TANAKA, K.; GOEL, S., PTEN Gene Expression and Mutations in the PIK3CA Gene as Predictors of Clinical Benefit to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapy in Patients With KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, v.11, n.2, p.143-150, 2012.

SOUZA, L. G.; SILVA, E.J.; MARTINS A.L.L.; MOTA, M.F.; BRAGA, R.C.; LIMA, E.M.; VALADARES, M.C.; TAVEIRA, S.F.; MARRETO, R.N., Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *Eur. J. Pharm.*, vol. 79, p.189-196, 2011.

STANISZ, H.; VOGT, T.; RASS, K., Chemotherapy for Melanoma Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Melanoma. In: MURPHY, M. J. (Ed.): Springer New York, 2012. p.247-263.

TABATT, K.; KNEUER, C.; SAMETI, M.; OLBRICH, C.; MÜLLER, R.H.; LEHR, C.M.; BAKOWSKY, U., Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *J. Control. Release*, v. 97, p. 321–332, 2004.

TANAKA, M. & GROSSMAN, H. B., In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin. *Gene Ther.*, v. 10, p. 1636–1642, 2003.

TAYLOR, C. W.; DALTON, W.S.; PARRISH, P.R.; GLEASON, M.C.; BELLAMY, W.T.; THOMPSON, F.H., Different mechanisms of decreased drug accumulation in doxorubicin and mitoxantrone resistant variants of the MCF7 human breast cancer cell line. *Brit. J. Cancer*, v. 63, p. 923-929, 1991.

TCHOBANOGLIOUS, G.; HAND, D.W.; TRUSSELL, R.R.; HOWE, K.J., Water treatment: principles and design, (2<sup>nd</sup> Ed.): John Wiley & Sons, Inc., 2005.

TORCELLO-GOMEZ, A.; SANTANDER-ORTEGA, M.J.; PEULA-GARCÍA, J.M.; MALDONADO-VALDERRAMA, J.; GÁLVEZ-RUIZ, M.J.; ORTEZA-VINUESA, J.L.; MARTÍN-RODRIGUEZ, A., Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties., *Soft Matter*, v.7, n.18, p. 8450-8461, 2011

TORCHILIN, V.P., Liposomes in drug delivery fundamentals and applications of controlled release drug delivery. (Ed.): Springer US, 2012. p.289-328. (*Advances in Delivery Science and Technology*).

TORCHILIN, V.P., Nanoparticles as drug carriers, (1a Ed.): World Scientific Pub, 2006, p.724

TSUI, H.W.; HSU, Y.H.; WANG, J.H.; CHEN, L.J., Novel behavior of heat of micellization of pluronics F68 and F88 in aqueous solutions. *Langmuir*, v. 24, n. 24, p. 13858-13862, 2008.

VERMA, I. M.; NALDINI, L.; KAFRI, T.; MIYOSHI, H.; TAKAHASHI, M.; BLÖMER, U.; SOMIA, N.; WANG, L.; GAGE, F.H., Gene Therapy: promises, problems and prospects. Springer-Verlag, 2000. 187p

VOLK, E. L.; ROHDE, K.; RHEE, M.; MCGUIRE, J.J.; DOYLE, L.A.; ROSS, D.D., Methotrexate Cross-Resistance in a Mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res.*, v. 60, p. 3514–3521, 2000.

WETZEL, F.; RÖNICKE, S.; MÜLLER, K.; GYGER, M.; ROSE, D.; ZINK, M.; KÄS, J., Single cell viability and impact of heating by laser absorption. *Eur. Biophys. J.*, v. 40, n. 9, p. 1109-1114, 2011.

YEAGLE, P.L., The Structure of Biological membranes, cap. 1, 3a ed. CRC Press, 2011.

ZHANG, F.; THROM, S.L.; MURLEY, L.L.; MILLER, L.A.; ZATECHKA, S.D.; KIPLIN, G.R.; KENNEDY, R.; STEWART, C.F., MDM2 antagonist nutlin-3a reverses mitoxantrone resistance by inhibiting breast cancer resistance protein mediated drug transport., *Biochem. Pharmacol.*, v.82, n.1, p.24-34, 2011.

ZHANG, L.; GU, F.X.; CHAN, J.M.; WANG, A.Z.; LANGER, R.S.; FAROKHZAD, O.C., Nanoparticles in medicine: therapeutic application and development., *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 83, p. 761-769, 2008.

ZHANG, S.; YANG, X.; MORRIS, M. E., Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport., *Mol. Pharmacol.*, v. 65, n. 5, p. 1208-1216, 2004.

ZHANG, Z.; DALLEK, S.; VOGT, R.; LI, Y.; TOPPING, T.D.; ZHOU, Y.; SCHOENUNG, J.M.; LAVERNIA, E.J., Degassing behavior of nanostructured Aland its composites, *Metall. Mater. Trans. A*, v.41, n.4, p. 532-541, 2009

ZHOU, J. ; WULFKUHLE, J.; ZHANG, H.; GU, P.; YANG, Y.; DENG, J.; MARGOLICK, J.B.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E.; ZHANG, Y., Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, n. 41, p. 16158-16163, 2007.

ZOOK, J. & VREELAND, W.N., Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *J. Lipos. Res.*, v.6, p. 1352-1360, 2010.

ZUHORN, I. S.; OBERLE, V.; VISSER, W.H.; ENGBERTS, J.B.; BAKOWSKY, U.; POLUSHKIN, E.; HOEKSTRA, D., Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency. *Biophys. J.*, v. 83, n. 4, p. 2096– 2108, 2002.

ZUHORN, I. S.; VISSER, W.H.; BAKOWSKY, U.; ENGBERTS, J.B.F.N.; HOEKSTRA, D.,  
Interference of serum with lipoplex – cell interaction: modulation of intracellular processing.  
*Biochim. Biophys. Acta*, v. 1560, p. 25– 36, 2002.

## Apêndice I: Currículo Lattes de Allan Radaic

**Nome** Allan Radaic

**Nome em citações bibliográficas** RADAIC, A.

**Nascimento** 08/11/1986 - São Paulo/SP - Brasil

**Endereço eletrônico** allanradaic@hotmail.com

### Formação Acadêmica/Titulação

**2010-2012** Mestrado em Biologia Funcional e Molecular.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil  
Título: Desenvolvimento de Nanopartículas lipídicas para carreamento conjuntos do gene para PTEN e mitoxantrona em células de câncer de próstata e mama, Ano de obtenção: 2012  
Orientador: Dra. Eneida de Paula  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#2009/13110-3)  
*Palavras-chave: câncer de próstata, nanopartículas lipídicas sólidas, mitoxantrona, carreadores lipídicos nanoestruturados, gene codificante PTEN*  
*Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Bioquímica, Genética Humana e Médica*  
*Setores de atividade : Atividades profissionais, científicas e técnicas, Pesquisa e desenvolvimento científico*

**2006-2009** Graduação em Bacharelado em Biotecnologia.  
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

### Áreas de atuação

1. Biologia Geral
2. Bioquímica
3. Biologia Molecular

### Idiomas

**Alemão** Compreende Pouco , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Pouco

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Português** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

## Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2o Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces (AutoOrg)**, 2010. (Encontro)  
Design of Solid Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery into Prostate Cancer Cells.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXIX Anual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq)**, 2010. (Encontro)  
Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Gene Delivery in Eukariotic cells.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos**, 2009. (Congresso)  
ACEITABILIDADE DE LEITES FERMENTADOS: COM E SEM PRESENÇA DA EMBALAGEM.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10o Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicado a medicina**, 2009. (Simpósio)  
Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas para carreamento de Genes.
5. **III Seminário sobre rotas tecnológicas da Biotecnologia: Oportunidades de Investimentos e Inovações**, 2007. (Seminário)

## Outras informações relevantes

- 1 Realização de estágio no exterior na University of Groningen (Groningen / Holanda) de Abril/2010 a julho/2010 Desenvolvimento do projeto de mestrado, com aprimoramento de técnicas como FAXS, microscopia fluorescentes, cultura de células e Western Blotting.
- 2 Bolsista FAPESP de Iniciação Científica (#2009/06610-0) no período de Junho/2009 a dezembro/2010 intitulada “Nanopartículas lipídicas Sólidas para gene delivery em células eucarióticas” com aprimoramento de técnicas moleculares, cultura de células, produção e otimização de nanopartículas lipídicas sólidas.