

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas:
estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2**

MICHELLE FRAGA

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas:
estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2**

Dissertação apresentada por **Michelle Fraga** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadores:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Dra. Ursula da Silveira Matte

PORTO ALEGRE, 2007

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05.06.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F811c Fraga, Michelle

Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas : estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2 / Michelle Fraga – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - 104 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanoemulsões catiônicas. 2. Fosfolipídios. 3. Citotoxicidade. 4. Complexação. 5. Transferência genética. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Matte, Ursula da Silveira. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Agradecimentos ao Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Laboratório 405 da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que disponibilizaram todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira e a minha co-orientadora Dra. Ursula da Silveira Matte, pela oportunidade, confiança, e sobretudo pela amizade. Sinto-me agraciada em poder ter trabalhado com duas pessoas tão brilhantes, exemplos a serem seguidos. Muito obrigada.

Aos amigos do Centro de Terapia Gênica do HCPA por toda contribuição científica, amizade e pelos momentos de descontração. Em especial aos colegas e amigos, Antônio Burlamaque, Bernardo Zandoná, Fernanda Oliveira, Fernanda Pereira, Gabriella dos Santos, Guilherme Baldo, Manoela Laux e Valeska Lagranha, os quais contribuíram mais diretamente neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório 405 da UFRGS por toda a colaboração e amizade. Em especial aos colegas Ana Paula Cappra Silva e Daniel Fasolo.

Ao Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do HCPA, ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da UFRGS e ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG pela colaboração e disponibilização de equipamentos durante o curso deste trabalho. Também ao professor Edison Carvalho pela contribuição nas análises de microscopia eletrônica.

Aos meus pais Francisco e Dolores, pelo amor, carinho, apoio, paciência e compreensão infinitos. Amo vocês.

A toda a minha família, especialmente Danielle e Jonathan meus irmãos, pelo companheirismo e compreensão em todas as horas. Amo todos vocês.

Agradeço a Deus por existir e me dar forças todos os dias para alcançar meus objetivos, o que inclui este mestrado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	05
Objetivo Geral.....	07
Objetivos Específicos	07
REVISÃO DA LITERATURA	09
Terapia Gênica	11
Plasmídeos e Vetores de transferência	13
Nanoemulsões Catiônicas	19
Composição das nanoemulsões	19
Métodos de preparação	22
Propriedades físico-químicas.....	24
Citotoxicidade	28
Estudos de transfecção.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS	41
Materiais	43
Ácido nucléico.....	43
Matérias-Primas	43
Aparelhos e Equipamentos.....	43
Reagentes e Solventes	44
Métodos.....	45
Preparação das nanoemulsões	45
Caracterização físico-química das nanoemulsões.....	46
Determinação do pH	46
Determinação do diâmetro de gotícula	47
Determinação do potencial zeta.....	47
Avaliação morfológica das nanoemulsões	47
Determinação da viscosidade	47
Determinação da tensão superficial.....	48
Complexação plasmídeo-nanoemulsão.....	49
Obtenção do plasmídeo pTracer TM -CMV2.....	49
Complexação do plasmídeo pTracer TM -CMV2 com as nanoemulsões.....	49
Ensaio de estabilidade dos complexos frente à enzima DNase I	49
Caracterização físico-química dos complexos pDNA/nanoemulsões.....	50
Avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões com sal de tetrazólio (MTT)	50
Avaliação da transferência gênica por PCR em tempo real.....	51
Análise estatística	52

RESULTADOS	53
Otimização das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea.....	55
Propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas.....	56
Complexação do pDNA com as nanoemulsões	60
Estabilidade frente à DNase I	64
Avaliação da citotoxicidade	66
Avaliação da transferência gênica.....	70
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico, utilizando diferentes quantidades ou proporções dos solventes etanol/água.....	55
Figura 2.	pH das nanoemulsões contendo concentrações crescentes do lipídeo catiônico estearilamina.....	57
Figura 3.	Diâmetro médio de gotícula, viscosidade, potencial zeta e tensão superficial das nanoemulsões em função da concentração de estearilamina utilizada.....	58
Figura 4.	Migração do pDNA a partir dos complexos formados entre pDNA e nanoemulsões PC, PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA e DOPE/EA em gel de agarose 1% por eletroforese.....	61
Figura 5.	Fotomicrografias (MET) dos complexos formados entre pDNA e nanoemulsões PC, PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA e DOPE/EA na relação de cargas[+/-]=2,0.....	63
Figura 6.	Migração do pDNA a partir dos complexos formados entre pDNA e nanoemulsões PC, PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA e DOPE/EA em gel de agarose 1% por eletroforese, após 30 minutos de incubação com a enzima DNase I.....	65
Figura 7.	Relação entre absorvância e número de células Hep G2 antes da adição do tampão Sorensen's glicina.....	66
Figura 8.	Relação entre absorvância e número de células Hep G2 após adição do tampão Sorensen's glicina.....	67
Figura 9.	Viabilidade das células Hep G2 após incubação durante 24 horas com quantidades crescentes das nanoemulsões PC, PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA e DOPE/EA antes e após o ajuste com o tampão Sorensen's glicina.....	68
Figura 10.	Viabilidade das células Hep G2 após incubação durante 24 horas com quantidades crescentes das nanoemulsões PC, PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA e DOPE/EA, complexadas com o pDNA em diferentes relações de carga [+/-], antes e após o ajuste com o tampão Sorensen's glicina.....	69
Figura 11.	Estrutura química dos fosfolipídeos utilizados neste estudo.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características dos vetores utilizados em terapia gênica	15
Tabela 2.	Estudos de citotoxicidade pDNA-nanoemulsões/método de avaliação.....	30
Tabela 3.	Composição final das nanoemulsões contendo os diferentes fosfolipídeos e o lipídeo catiônico estearilamina (% p/p).....	46
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas contendo os diferentes fosfolipídeos.....	60
Tabela 5.	Propriedades físico-químicas dos complexos pDNA/nanoemulsões catiônicas contendo os diferentes fosfolipídeos na relação de cargas [+/-]=2,0.....	62
Tabela 6.	Quantidade de DNA do gene GFP detectada no ensaio de transfecção das células Hep G2 com os complexos pDNA/nanoemulsões catiônicas através da determinação por PCR em tempo real.....	71
Tabela 7.	IC ₅₀ das diferentes nanoemulsões e complexos com pDNA antes e após adição do tampão Sorensen's glicina (SG).....	81

ABREVIATURAS

- AAV – vírus adeno-associado
- COL – colesterol
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DOPC – dioleilfosfatidilcolina
- DC-Chol – 3 β [N-(N', N'-dimetilaminoetano) carbamoil] colesterol
- DOPE – dioleilfosfatidiletanolamina
- DOTAP – 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano
- DSPC – diestearilfosfatidilcolina
- DSPE – diestearilfosfatidiletanolamina
- DSPE-PEG – diestearilfosfatidiletanolamina-poli(etileno)glicol
- EA – estearilamina
- EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo
- GFP – do inglês, green fluorescent protein- proteína verde fluorescente
- MET – microscopia eletrônica de transmissão
- MTT– brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
- OA – oleilamina
- PC – lecitina/fosfatidilcolina
- PCR – do inglês, polymerase chain reaction- reação em cadeia da polimerase
- pDNA – plasmídeo
- PE-PEG – fosfatidiletanolamina-poli(etileno)glicol
- PEG – poli(etileno)glicol
- PEG-NHS – poli(etileno)glicol N-hidroxissuccinimidil
- PEI – poli(etileno)imina
- RNA – ácido ribonucléico
- TCM – triglicerídeos de cadeia média
- TCL – triglicerídeos de cadeia longa
- [+/-] – relação de cargas positivas (lipídeo catiônico) e negativas (pDNA)

RESUMO

Nanoemulsões catiônicas têm sido recentemente propostas como sistemas carreadores de DNA. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes fosfolípidos sobre propriedades dos complexos formados entre nanoemulsões e pDNA (pTracerTM-CMV2). Em uma primeira etapa, nanoemulsões catiônicas constituídas de triglicerídeos de cadeia média, estearilamina, lecitina de gema de ovo ou fosfolípidos isolados (DSPC, DOPC, DSPE ou DOPE), glicerol e água foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea. Independente do tipo de fosfolípido empregado, esse procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões catiônicas monodispersas com diâmetro de gotícula e potencial zeta de cerca de 250 nm e +50 mV, respectivamente. A complexação do pDNA com as nanoemulsões catiônicas, avaliada através do retardamento de migração do pDNA em gel de agarose por eletroforese, foi total quando o complexo apresenta uma relação de cargas $[+/-] \geq 1,0$. Nestas condições, os complexos formados foram protegidos da degradação pela enzima DNase I. Em uma segunda etapa, a citotoxicidade das nanoemulsões e dos complexos com o pDNA sobre células Hep G2 foi avaliada, através do ensaio de MTT. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de quantidades crescentes das nanoemulsões, conduz a uma toxicidade progressiva sobre as células, independente do pH do meio. Dentre as formulações estudadas, aquelas estabilizadas pelos fosfolípidos DSPC e DSPE, de elevada temperatura de transição de fases, foram marcadamente menos tóxicas, em comparação com as formulações obtidas com lecitina, DOPC e DOPE. Essa mesma tendência foi detectada para os complexos formados com o pDNA. Em uma última etapa, foi realizado um estudo preliminar de transferência gênica em células Hep G2, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Dentre as diferentes formulações testadas, a maior quantidade de DNA de GFP detectada parece ser para a formulação obtida com o fosfolípido DSPC, ilustrando as potencialidades de uso das nanoemulsões desenvolvidas como reagentes de transfecção de pDNA em células Hep G2. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos demonstra o efeito dos fosfolípidos empregados sobre propriedades físico-químicas, complexação, estabilidade, citotoxicidade e transfecção de nanoemulsões catiônicas como sistemas carreadores de pDNA.

Palavras-chave: plasmídeos, nanoemulsões catiônicas, fosfolípidos, caracterização físico-química, citotoxicidade, transferência gênica

ABSTRACT

Cationic nanoemulsions have been recently considered as potential delivery systems for DNA. The aim of the present work was to evaluate the influence of different phospholipids on the properties of complexes formed between nanoemulsions and pDNA (pTracerTM-CMV2). First, cationic nanoemulsions composed of medium chain triglycerides, stearylamine, egg lecithin or isolated phospholipids (DSPC, DOPC, DSPE or DOPE), glycerol and water were prepared through spontaneous emulsification process. Independently of the type of phospholipid used this procedure results in monodisperses cationic nanoemulsions with droplet size and zeta potential of about 250 nm and +50 mV, respectively. The complexation of pDNA with cationic nanoemulsions, analyzed by agarose gel retardation assay was total when the complex possesses a charge relation $[+/-] \geq 1.0$. In these conditions the complexes were protected from enzymatic degradation by DNase I. After that, the cytotoxicity of the nanoemulsion and the complexes with pDNA in Hep G2 cells was evaluated through MTT assay. The results showed that the addition of increasing amount of nanoemulsion leads to a progressive toxicity on the cells independently of the media's pH. Among the studied formulations the ones stabilized with the phospholipids DSPC and DSPE, that have elevated phase transition temperatures, were much less cytotoxic in comparison with the formulations obtained with lecithin, DOPC and DOPE. This same trend was detected for the complexes formed with pDNA. Finally a preliminary study of gene transfer to Hep G2 cells was performed using real-time PCR technique. Among the different formulations tested, the major quantity of reporter DNA detected seems to be for the formulation obtained with the DSPC phospholipid. This shows the potentialities of the use of nanoemulsions as transfection reagents of pDNA in Hep G2 cells. In conclusion, the overall results show the effect of the phospholipids on physicochemical properties, complexation, stability, cytotoxicity and transfection of cationic nanoemulsions as delivery systems for pDNA.

Keywords: plasmids, cationic nanoemulsions, phospholipids, physicochemical characterization, cytotoxicity, gene transfer

INTRODUÇÃO

O seqüenciamento do genoma humano e a elucidação de vários mecanismos moleculares envolvidos em diversas doenças originaram o desenvolvimento de novas terapias. Neste contexto, as terapias com ácidos nucléicos representam um dos maiores avanços nas ciências biomédicas e abrem interessantes perspectivas na terapêutica (OPALINSKA E GEWIRTZ, 2002).

Dentre as terapias que envolvem ácidos nucléicos encontra-se a terapia gênica, cujo conceito envolve a transferência de material genético para uma célula, tecido ou um órgão inteiro, visando à cura de uma doença, ou no mínimo a melhora clínica do paciente (VERMA e WEITZMAN, 2005). Tanto doenças hereditárias como adquiridas têm sido alvos constantes de estratégias de terapia gênica. O tratamento de doenças através da transferência de genes foi originalmente direcionado para doenças hereditárias, causadas normalmente por defeitos num único gene, como a fibrose cística, as hemofilias, as hemoglobinopatias e as distrofias musculares. Entretanto, a maioria dos experimentos clínicos de terapia gênica, atualmente em andamento, está direcionada para o tratamento de doenças adquiridas como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, doenças cardiovasculares e, em especial, diversos tipos de câncer (NARDI et al., 2002; NATHWANI et al., 2004; SAAD, 2000).

Contudo, apesar das reconhecidas potencialidades terapêuticas dos ácidos nucléicos, diversas aplicações permanecem limitadas pela sua reduzida penetração intracelular. O elevado peso molecular e o caráter polianiônico limitam o seu transporte intracelular em decorrência da repulsão eletrostática com as membranas celulares. Após a penetração, a mobilidade dos ácidos nucléicos é restrita devido a diversos fatores, como a presença de agregados moleculares, obstáculos citoplasmáticos imóveis e a associação dos mesmos com proteínas citosólicas (LECHARDEUR et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Além disso, a instabilidade dos ácidos nucléicos em fluídos biológicos devido à rápida degradação frente ao ataque enzimático limita o uso destas moléculas *in vivo* (BROWN et al., 2001; CAMPBELL et al., 2001; LECHARDEUR et al., 2005).

Neste contexto, na última década, a complexação de ácidos nucléicos (em fita simples ou dupla) com nanoemulsões catiônicas tem sido correntemente investigada (BIVAS-BENITA et al., 2004; KIM et al., 2005; LIU et al., 1996; MARTINI, 2005; MIN et al., 2005; TEIXEIRA et al., 1999, 2001, 2003; YI et al., 2000). Esses sistemas são constituídos de um núcleo oleoso (de origem natural ou sintética) estabilizado por uma mistura binária de fosfolipídeos e lipídeos catiônicos. Os ácidos nucléicos interagem espontaneamente em solução com os lipídeos catiônicos de carga oposta formando um complexo iônico. As gotículas carregadas positivamente conduzem a um aumento da penetração intracelular dos ácidos nucléicos devido às interações eletrostáticas estabelecidas com as membranas das células carregadas negativamente (KIM et al., 2005; MIN et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2003). Além disso, a adsorção dos ácidos nucléicos em nanoemulsões catiônicas pode reduzir a sua degradação enzimática pelas nucleases (BIVAS-BENITA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2003; YI et al., 2000).

Contudo, até o momento, ainda não foram realizados estudos comparativos relativos à avaliação da influência da composição sobre as propriedades físico-químicas e biológicas de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos. Assim, a presente dissertação visa a investigar o efeito de diferentes fosfolipídeos (co-tensoativos) sobre características físico-químicas, citotoxicidade e transfecção de complexos formados entre nanoemulsões e um plasmídeo (pDNA), denominado pTracerTM-CMV2, em células Hep G2, uma linhagem de células isoladas de carcinoma hepatocelular humano, a qual vem sendo correntemente empregada em estudos de transfecção de nanoemulsões (CHOI et al., 2004; MIN et al., 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas como sistema de liberação para um plasmídeo comercial pTracerTM-CMV2 em células Hep G2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as condições de obtenção de nanoemulsões monodispersas através do procedimento de emulsificação espontânea.
- Preparar e caracterizar as propriedades físico-químicas de nanoemulsões catiônicas estabilizadas por diferentes fosfolipídeos.
- Avaliar a complexação do pDNA pTracerTM-CMV2 com as nanoemulsões desenvolvidas.
- Investigar a estabilidade do pDNA pTracerTM-CMV2 complexado com as nanoemulsões frente à enzima DNase I.
- Caracterizar a citotoxicidade das nanoemulsões e complexos com pDNA pTracerTM-CMV2 em células Hep G2, através do ensaio de MTT.
- Avaliar, preliminarmente, a eficiência de transfecção dos complexos nanoemulsão/pDNA em células Hep G2 utilizando PCR em tempo real.

REVISÃO DA LITERATURA

Terapia gênica

A terapia gênica envolve o transporte intracelular de material genético que, através da expressão ou inibição de uma proteína no tempo, local e na quantidade desejada resulte em benefício terapêutico. Os ensaios de terapia gênica exigem um protocolo que assegure em primeira análise a segurança e inocuidade do tratamento. Assim, antes da aplicação em humanos, o gene terapêutico e o sistema de transferência desenvolvido são testados em células em cultura e em animais. De acordo com os resultados destes primeiros ensaios, passa-se então para os ensaios clínicos em pacientes ou em indivíduos saudáveis (GLOVER et al., 2005; NARDI et al., 2002; VERMA e WEITZMAN, 2005).

A terapia gênica foi originalmente contextualizada para o tratamento de desordens genéticas herdadas (NATHWANI et al., 2004). Entretanto, dos 1283 ensaios clínicos existentes até abril de 2007, mais de dois terços têm o foco voltado para doenças adquiridas, no qual o câncer representa a grande maioria (67%), seguido de doenças cardiovasculares, infecciosas e outros protocolos em proporções aproximadamente iguais entre si. Poucos destes estudos têm progredido além da fase I, a qual trata da avaliação de efeitos tóxicos (www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

As propriedades únicas dos tumores, como anormalidades no ciclo celular e apoptose, migração e metástase, neoangiogênese ou perfil antigênico exclusivo são alvos de estratégias anti-câncer. Além destas, especificidade para o tecido tumoral alvo pode ser alcançada na terapia gênica para o câncer de várias maneiras, como liberação direcionada, métodos físicos e ainda a complexação com compostos lipídicos (nano, poli e lipoplexos). Estudos clínicos nessa área têm sido realizados principalmente com vetores virais (retrovírus e adenovírus), mas algumas estratégias não-virais têm sido descritas, como por exemplo, através do uso dos lipoplexos (WAGNER et al., 2004).

Contudo, um avanço que permita a aplicação clínica da terapia gênica além da fase I, ainda permanece a ser alcançado. As razões para tanto são a falta de segurança no uso dos vetores virais pela imunogenicidade nata apresentada por estes. Além disso, o risco de mutagênese insercional é um grande obstáculo (THOMAS et al., 2003). Este risco ficou evidenciado no estudo de Cavazzana-Calvo et al. (2000) quando foi obtido o primeiro sucesso da terapia gênica na cura de uma doença fatal (Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada-SCID), porém, dois pacientes de um número pequeno de participantes desenvolveram leucemia. Por outro lado, a baixa eficiência de liberação e expressão transitória dos transgenes pelos vetores não-virais é o que limita seu uso (GLOVER et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Segundo Thomas et al. (2003), essas considerações indicam que o sucesso da terapia gênica será encontrado através do total entendimento da biologia e farmacologia dos vetores empregados.

As terapias com ácidos nucleicos podem ser do tipo: correção, quando ocorre a inserção de um gene funcional no local de um não funcional ou a deleção de um gene deletério; complementação, quando é feita a introdução de uma cópia normal sem modificação do original; ou ainda adição, quando há o acréscimo de um gene ausente no genoma (MATTE e GIUGLIANI, 2004). Independente da abordagem, o material genético a ser utilizado em experimentos de transferência gênica é mais comumente encontrado em duas formas: na forma plasmidial, onde um gene de interesse é inserido em um plasmídeo de expressão eucariota, promovendo assim a síntese da proteína desejada nas células ou tecidos alvos, ou na forma viral, onde o transgene substitui regiões gênicas de certos vírus. Nestes vetores virais, o vírus ao ser modificado é atenuado e incapaz de causar qualquer quadro patológico. O material genético a ser introduzido também pode ser encontrado em algumas outras formas, como uma seqüência de DNA linearizada ou um oligonucleotídeo. Esses fragmentos de ácidos nucleicos são pouco utilizados uma vez que apresentam rápida degradação pelas nucleases citoplasmáticas (NARDI et al., 2002).

A terapia gênica pode ser *ex vivo*, na qual um tecido ou parte dele é retirado do indivíduo e é submetido aos vetores de transferência no laboratório, sendo posteriormente reimplantado no paciente ou *in vivo*, na qual os vetores são introduzidos diretamente na corrente sanguínea (injeção sistêmica) ou no tecido do paciente (injeção *in situ*) (NARDI et al., 2002; NATHWANI et al., 2004).

Os métodos de transferência gênica são geralmente divididos em três categorias, a) métodos físicos: o transgene é introduzido mecanicamente nas células, b) métodos químicos: o vetor é alguma substância de origem química e c) métodos biológicos: emprego de organismos que naturalmente possuem a capacidade de transferir material genético, como os vírus ou algumas bactérias. A escolha do método a ser empregado é feita de acordo com a doença, a célula ou tecido-alvo, o tamanho e tipo de transgene a ser expresso e o tempo e quantidade de expressão que se deseja obter, entre outros (NARDI et al., 2002; WAGNER et al., 2004).

A terapia gênica tem muitos obstáculos a superar, tais como: a célula alterada geneticamente tem que permanecer funcional por um tempo longo, o tecido alterado não deve se transformar em tecido canceroso, o vetor viral não deve ocasionar uma ativação de fragmentos de genes adormecidos de outros vírus e o vetor não deve ser reconhecido por células do sistema imunológico como sendo um antígeno, pois a resposta imune irá destruí-lo antes de seu efeito, podendo causar até mesmo uma reação alérgica (NARDI et al., 2002; NATHWANI et al., 2004).

Plasmídeos e Vetores de transferência

O plasmídeo é o vetor mais simples e a sua administração na forma de DNA nú ou complexado resulta na expressão significativa do transgene (NISHIKAWA et al., 2005). É estimado que no mínimo 10^5 plasmídeos por célula sejam requeridos no compartimento extracelular para assegurar que poucas moléculas de DNA entrarão no núcleo de células não-mitóticas (LECHARDEUR et al., 2005).

Os plasmídeos são amplamente utilizados como vetores de clonagem, sendo bem adaptados para receberem material genético com variação de tamanho desde 1 até 200 Kb (1 kilobase= mil pares de bases). São moléculas de DNA circular de fita dupla e extracromossômico que possuem capacidade de replicação autônoma. Na natureza, ocorrem em bactérias e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, sendo também manipulados pelo ser humano. Frequentemente, transportam genes que conferem resistência a antibióticos, que são utilizados para distinguir entre as células hospedeiras que receberam ou não o vetor (ZAHA et al., 1996).

Desde que Wolff et al. (1990) relataram que produtos de transgene podem ser obtidos em músculo esquelético através de uma simples injeção intramuscular de plasmídeo nú, é atualmente amplamente aceito que plasmídeo é um vetor não-viral promissor para transferência gênica *in vivo*. Para melhorar a liberação e a captação celular do pDNA após administração *in vivo*, uma variedade de sistemas de liberação catiônicos têm sido desenvolvidos. A adição de reagentes catiônicos ao pDNA tem por objetivo decrescer a sua carga negativa e facilitar a sua interação com as membranas celulares, bem como para proteger o DNA da hidrólise ocasionada pelas nucleases presentes nos fluidos biológicos, para evitar interações indesejáveis com o sangue e sítios que não os alvos, e também para aumentar a captação pelas células-alvo (NISHIKAWA et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Diversos fatores, como por exemplo, a via de administração, o uso de vetores catiônicos e a técnica de administração afetam em grande proporção a distribuição tecidual dos plasmídeos e a expressão subsequente do transgene (NISHIKAWA et al., 2005).

Um sistema de liberação deve ser capaz de transferir genes eficientemente numa variedade de tecidos, sem causar nenhum efeito patogênico associado. O processo de liberação e expressão gênica é conhecido como transdução e os vetores de transferência podem ser virais ou não-virais, os quais apresentam características que se encontram resumidamente sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1. Características dos vetores utilizados em terapia gênica (adaptado de NATHWANI et al., 2004 e VERMA e SOMIA, 1997).

Características	Tipo de vetor				
	Não-viral	Retrovírus	Lentivírus	Adenovírus	AAV
Capacidade de empacotamento	Elevada	~80Kb	-	~300Kb	46kB
Facilidade de produção	Fácil	Média	Não conhecida	Fácil	Difícil
Integração no genoma hospedeiro	Rara	Sim	Sim	Não	Rara
Duração da expressão	Transitória	Curta	Longa	Transitória	Longa
Transdução de células pós-mitóticas	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Imunidade pré-existente	Não	Não	Não	Extensa	Média
Aspectos quanto à segurança	Seguro em relação aos virais	Mutagênese insercional	Mutagênese insercional	Resposta inflamatória, Toxicidade	Não
Rota de liberação do gene	<i>Ex/In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex/In vivo</i>	<i>Ex/In vivo</i>	<i>Ex/In vivo</i>
Estabilidade	Dependente do sistema	Boa	Não testada	Boa	Boa
Problemas imunológicos	Não descritos	Poucos	Poucos	Extenso	Não sabido

Os vetores virais são derivados de vírus com genoma de RNA ou de DNA e são representados como vetores de integração e vetores que não se integram ao genoma hospedeiro, respectivamente. O primeiro promete uma expressão duradoura do produto gênico deficiente. Porém, transdução gênica eficiente também pode ser alcançada por vetores que são mantidos como episômos, especialmente em células quiescentes (VERMA e WEITZMAN, 2005). Existem, no momento, cinco classes principais de vetores virais com aplicação clínica, que são retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV) e herpes simplex-1 (LUNDSTROM et al., 2003; THOMAS et al., 2003; VERMA e WEITZMAN, 2005). Devido às várias propriedades de cada vetor viral, a definição da sua faixa de aplicação depende de fatores como capacidade de empacotamento, especificidade celular ou tecidual, competência de replicação, integração no genoma e duração da expressão do transgene (LUNDSTROM et al., 2003).

Os vírus de RNA mais usados são derivados dos retrovírus e estes estão entre os primeiros sistemas de liberação desenvolvidos para terapia gênica. Estes podem se integrar permanentemente no genoma da célula infectada, mas requerem células em divisão para transdução. Além disso, a maior preocupação no uso dos retrovírus está no fato de poder causar mutagênese insercional. Dos vetores derivados de vírus com genoma de DNA, os mais promissores são os adenovírus e AAVs. Os primeiros são capazes de liberar genes eficientemente a uma grande variedade de tipos celulares em divisão e quiescentes, mas a forte resposta imune e toxicidade frente às células infectadas, limitam a expressão gênica *in vivo*. Os AAV também infectam muitos tipos de células, tanto em divisão quanto quiescentes, apresentam baixa toxicidade, mas possuem uma limitada capacidade de empacotamento. Os herpes vírus liberam grandes quantidades de DNA exógeno, entretanto, a citotoxicidade e a manutenção da expressão do transgene ainda são obstáculos para esse sistema viral (KOOSTRA e VERMA, 2003; ROBBINS et al., 1998; VERMA e WEITZMAN, 2005). Retrovírus, adenovírus e AAV têm sido avaliados em vários ensaios clínicos fase I para o tratamento de doenças como câncer, fibrose cística, doença de Gaucher e artrite (ROBBINS et al., 1998).

Os vetores virais têm sido amplamente empregados para atingir expressão gênica eficiente, porém problemas relacionados à segurança no uso dos mesmos, bem como a forte resposta imune gerada por estes, têm limitado seu uso. Assim sendo, vetores não-virais têm se tornado uma opção promissora, justamente pelo fato de serem mais seguros, estáveis, fáceis de produzir e simples de manipular (KIM et al., 2001 e 2002; LI e HUANG, 2000; LIU et al., 1996; MIN et al., 2005;).

Os vetores não-virais são divididos basicamente em três grandes grupos, envolvendo a combinação de ácidos nucléicos com polímeros catiônicos (poliplexos), com lipídeos (lipoplexos) ou ainda a associação ou o encapsulamento em nanopartículas (nanoplexos) (NISHIKAWA et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Os lipoplexos são os mais utilizados e são compostos por um lipossoma catiônico o qual é formado por uma bicamada fechada de lipídeos catiônicos preenchida por água. Essas

vesículas são positivamente carregadas e interagem com as moléculas de DNA que são negativamente carregadas para formar um complexo estável (CHOI et al., 2002). A aplicação de lipoplexos como agentes de transfecção tem sido correntemente descrita por diversos grupos (BURLAMAQUE-NETO, 2005; ELOUHABI et al., 2005; WASUNGU et al., 2006; ZHANG et al., 2004).

O vetor ideal possui algumas características desejáveis, entre as quais podemos destacar as seguintes: capacidade de acomodação de um transgene de tamanho ilimitado; baixa imunogenicidade e citotoxicidade; expressão estável do transgene; direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos; baixo custo; fácil produção e manipulação, entrada em células em divisão ou quiescentes e ainda a possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade (NARDI et al., 2002; SOMIA e VERMA, 2000; VERMA e WEITZMAN, 2005).

Após administração *in vivo* os genes encontram vários obstáculos que precisam ser superados para uma terapia gênica de sucesso. Primeiramente, os genes devem estar veiculados em uma forma farmacêutica compatível com a via de administração, e de acordo com essa via, diferentes fenômenos podem ser observados. Quando a administração é feita de forma localizada o obstáculo maior é intracelular, ou seja, encontrar um caminho para o interior da célula-alvo; escapar da degradação endolisossômica e ser transportado até o núcleo são pontos críticos. Em contrapartida, quando a administração é sistêmica, outros obstáculos referentes à possibilidade de adesão (ligação não-específica) aos tecidos, agregação, embolização e fagocitose, bem como o extravasamento devem ser considerados (NISHIKAWA et al., 2005).

Durante a década passada tornou-se evidente que além das barreiras extracelulares e celulares, os obstáculos intracelulares com características específicas a tecidos e órgãos, reduzem a eficiência de transfecção de vetores não-virais. Enquanto a interpretação original enfatiza o papel do envelope nuclear como uma das maiores barreiras intracelulares, dados recentes sugerem que a mobilidade restrita, bem como a instabilidade metabólica dos plasmídeos, em conjunto com o aprisionamento

endolisossomal, contribuem para a reduzida eficiência de transfecção dos plasmídeos. A contribuição individual de cada um destes componentes parece ser dependente do tipo celular e do tipo de vetor (LECHARDEUR et al., 2005).

Existem diversas barreiras que dificultam o transporte do pDNA até o núcleo, entre elas, a internalização e degradação de DNA no compartimento endolisossômico. O tamanho e a composição dos complexos influenciam no mecanismo de internalização. Os lipoplexos grandes (até 500 nm) entram preferencialmente na célula por receptores e endocitose independente de clatrina, enquanto que complexos menores (< 200nm) podem ser internalizados por processo de endocitose clatrina dependente não específico (LECHARDEUR et al., 2005; MONTIER et al., 2004). O escape endolisossômico é considerado uma das principais barreiras para liberação do pDNA no núcleo. Estudos têm demonstrado que a liberação citoplasmática de lipoplexos internalizados envolve a neutralização do lipídeo catiônico por macromoléculas aniônicas como lipídeos e proteoglicanos, a fusão dos lipídeos catiônicos ou ainda a desestabilização da membrana por lipídeos pH sensíveis (LECHARDEUR et al., 2005).

Outra barreira que também é encontrada pelos plasmídeos é representada pelo seqüestro e degradação dos mesmos no citoplasma. Propriedades físico-químicas e biológicas do citosol podem impor obstáculos adicionais à liberação gênica por vetores sintéticos, a estrutura na forma de malha do citoesqueleto, a presença de organelas e a alta concentração de proteínas no citoplasma limitam a difusão de moléculas de grande tamanho como os plasmídeos (LECHARDEUR et al., 2005). O envelope nuclear é o último obstáculo para a entrada no núcleo do pDNA. Moléculas de tamanho inferior a 40 kDa difundem passivamente através do complexo de poros nuclear (CPN), contudo, as de tamanho superior à 60 KDa ou contém sinais alvo-específicos, a seqüência de localização nuclear (SLN) ou associam-se com outros polipeptídeos para atravessar o CPN de uma maneira dependente de energia. A maior transfectabilidade das células em divisão comparada às células quiescentes, sugere que o pDNA entra no núcleo preferencialmente após desagregação do envelope celular durante a mitose (LECHARDEUR et al., 2005; WAGNER et al., 2004).

Nanoemulsões catiônicas

Composição das nanoemulsões

O desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas como um potencial sistema para liberação de ácidos nucléicos tem merecido atenção por parte de diversos pesquisadores nos últimos anos. Nanoemulsões são geralmente compostas por um núcleo oleoso de origem vegetal ou semi-sintética estabilizado na sua superfície por uma mistura binária de fosfolipídeos e lipídeos catiônicos. A adição de um lipídeo catiônico confere carga positiva à superfície da gotícula, permitindo a associação dos ácidos nucléicos à interface das nanoemulsões através da formação de um par iônico em meio aquoso (FRONZA et al., 2004; MARTINI, 2005). Vários fatores afetam a eficiência da transfecção de sistemas de liberação de genes mediados por lipídeos catiônicos, tais como: composição quali/quantitativa, propriedades físico-químicas (como diâmetro e carga) e razão de cargas do complexo lipídeo/DNA (MIN et al., 2005).

O núcleo oleoso das nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos varia entre 5 e 35 % da composição final das formulações (CHOI et al., 2004; OTT et al., 2002). A seleção do óleo é geralmente realizada com base nas propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações. Óleos de origem vegetal ou semi-sintética autorizados para uso parenteral, constituídos de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL), têm sido correntemente empregados (KLANG e BENITA 1998). Mais recentemente Yoo et al. (2004) descreveram o uso de um óleo de elevada densidade, o lipiodol, visando a avaliar a influência desta propriedade sobre a eficiência de transfecção de pDNA em células aderentes.

Desde a primeira descrição da transfecção *in vitro*, de sucesso, utilizando lipídeos catiônicos por Felgner et al. (1987), a literatura, nos últimos anos, tem demonstrado um progresso substancial na aplicação de sistemas sintéticos de liberação de genes. Um dos aspectos para este progresso é a síntese de lipídeos

catiônicos (LI e HUANG, 2000). Um lipídeo catiônico é composto por três domínios: uma cabeça polar, uma região de ligação e uma cauda hidrofóbica. Os domínios polar e hidrofóbico dos lipídeos catiônicos podem ter efeitos tanto na transfecção como na toxicidade. Dentre os lipídeos catiônicos mais empregados na composição das nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de polinucleotídeos encontram-se a estearilamina (EA), o 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP) e o 3 β [N-(N', N'-dimetilaminoetano) carbamoil] colesterol (DC-Chol). Lipídeos catiônicos com ligações éster na região de ligação, como é o caso do DOTAP, são biodegradáveis e associados com menor citotoxicidade em cultura de células (DASS, 2004).

Apesar do relato da obtenção de nanoemulsões catiônicas apenas com a adição de lipídeos catiônicos (KIM et al., 2003), a grande maioria utiliza esses em misturas binárias com fosfolipídeos. Os fosfolipídeos podem ser originários de fontes naturais, como as lecitinas, e semi-sintéticos, como dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e diestearilfosfatidilcolina (DSPC). O seu uso tem sido correntemente descrito por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999). Além das cadeias hidrocarbonadas que podem ser saturadas (DSPC) ou insaturadas (DOPE), os fosfolipídeos apresentam um grupamento polar dependente do pH do meio. Desta forma, um dos objetivos da utilização destes lipídeos em combinação com os lipídeos catiônicos é a otimização da relação de cargas positivas (lipídeos catiônicos) e negativas (ácidos nucleicos). Adicionalmente, segundo Kim et al. (2001), a adição de fosfolipídeos semi-sintéticos, como DOPE, é capaz de melhorar a atividade de transfecção *in vitro* e *in vivo* de nanoemulsões catiônicas devido as suas propriedades fusogênicas.

O uso de fosfolipídeos ligados covalentemente ao polietilenoglicol (PEG), como o diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG), em associação com outros fosfolipídeos, tem sido relatado na composição de emulsões como veículo de ácidos nucleicos (CHESNOY et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001a, 2001b; YI et al., 2000). A incorporação desses lipídeos nas nanoemulsões tem alguns objetivos, entre eles, aumentar a estabilidade física das formulações e reduzir as interações de proteínas

com as nanoemulsões catiônicas. De fato, tem sido demonstrado que a presença de lipídeos-PEG na interface de sistemas coloidais cria uma barreira estérica ao acesso de proteínas, prevenindo assim a agregação das nanoestruturas (HUNG et al., 2005; LIU et al., 1996).

Com os mesmos objetivos da incorporação de lipídeos-PEG, alguns autores descrevem o uso de tensoativos não-iônicos na preparação de nanoemulsões contendo DNA (CHOI et al., 2004; HARA et al., 1997; KIM et al., 2001; LIU et al., 1996; MIN et al., 2005). Os tensoativos propostos nessas formulações são geralmente os ésteres de ácidos graxos do sorbitano, como a série dos Tweens[®] e Spans[®], que de maneira geral, são aprovados para uso parenteral (BENITA e LEVY, 1993). O Span 80[®] apresenta o mesmo grupamento hidrofóbico do Tween 80[®], contudo, diferindo na presença de três cadeias de polioxietileno por molécula no Tween 80[®]. Aos tensoativos como o Tween 80[®], têm sido atribuída a formação de uma barreira estérica na interface através de suas cadeias de caráter hidrofílico, impedindo a aproximação e agregação das nanoemulsões com proteínas (CHOI et al., 2002; HARA et al., 1997).

A adição de adjuvantes na fase aquosa de nanoemulsões é necessária a fim de ajustar algumas propriedades das formulações, como a isotonicidade e o pH, de modo que seja compatível com os fluídos biológicos, de acordo com a via de administração pretendida. Apesar do relato de uma atividade hemolítica do glicerol superior a outros isotonzantes como o xilitol e sorbitol, descrito por Jumaa e Muller (1999), o glicerol é atualmente o isotonzante mais utilizado na composição de emulsões de uso parenteral e pode ser encontrado em algumas das formulações catiônicas (ARII et al., 1999; TEIXEIRA et al., 1999; TRIMAILLE et al., 2001, 2003). O uso de eletrólitos como isotonzantes de emulsões é desaconselhado uma vez que esses podem interagir fortemente com colóides, influenciando a sua estabilidade (WASHINGTON, 1996).

Métodos de preparação

De maneira geral, quatro procedimentos têm sido descritos para a produção de nanoemulsões catiônicas como sistemas de transferência gênica. Esses procedimentos utilizam como equipamentos homogeneizadores de alta pressão, ultra-som ou microfluidizadores (BIVAS-BENITA et al., 2004; MAA e HSU, 1999; NAINI e SINGH, 2002) ou ainda a técnica pode ser baseada na mistura de solventes orgânicos, caso da emulsificação espontânea (TEIXEIRA et al., 2002; TRIMAILLE et al., 2003).

As técnicas de microfluidização e homogeneização a alta pressão para o preparo de sistemas lipídicos são amplamente descritas na literatura (BIVAS-BENITA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 1999, 2001, 2003; YI et al., 2000). Essas técnicas permitem a obtenção de emulsões monodispersas de diâmetro de gotícula reduzido em grande escala. A obtenção de nanoemulsões por estes métodos requer a preparação prévia de uma emulsão primária, geralmente à quente (~70 °C), seguida da homogeneização por microfluidizador ou homogeneizador de alta pressão. Os homogeneizadores de alta pressão consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positiva a qual injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em uma válvula homogeneizadora, enquanto que os microfluidizadores são constituídos de uma câmara de interação onde o fluido é injetado e homogeneizado por corte, impacto ou cavitação (LACHMAN et al., 2001). Dependendo do tipo de equipamento utilizado, a homogeneização através dessa técnica fica limitada à preparação de grandes volumes de produto final, reduzindo a sua aplicação em estudos de bancada. Além disso, a utilização de elevadas temperaturas pode representar uma desvantagem no uso deste procedimento para o preparo de sistemas lipídicos termossensíveis (TEIXEIRA et al., 2002).

O uso de ultra-som também tem sido descrito por vários autores para o preparo de nanoemulsões catiônicas (BARUT et al., 2005; CHOI et al., 2004; KIM et al., 2001, 2002, 2003, 2005). Nesta técnica o fluido é primeiramente conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária

entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina e a vibração desta produz ondas ultrasônicas, que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de diâmetro reduzido (BOLDYREN, 1995; MAA e HSU, 1999; MIZUKOSHI et al., 1999). Esse procedimento apresenta como desvantagens o aquecimento excessivo da amostra, contaminação do produto com resíduos de titânio provenientes da sonda, formação de gotículas de tamanho polidisperso e dificuldades de transposição de escala (SORGI e HUANG, 1996; WASHINGTON e DAVIS, 1988).

Mais recentemente foi descrito o procedimento de emulsificação espontânea para o preparo dos sistemas lipídicos. Esse procedimento baseia-se na emulsificação espontânea dos constituintes da fase interna (previamente solubilizados em um solvente orgânico hidromiscível) em água, seguido da retirada do solvente geralmente por destilação sob pressão reduzida. A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente na água, observando-se rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas (BOUCHEMAL et al., 2004; PARK et al., 1999;). Diversos parâmetros podem influenciar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas, entre eles, a composição quali e quantitativa das formulações e as condições de emulsificação empregadas (BOUCHEMAL et al., 2004; MARTINI et al., 2007; MOSQUEIRA et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2002). Esse procedimento apresenta como vantagens a possibilidade de preparação de pequenos volumes de amostra em baixas temperaturas, o que pode ter interesse para sistemas lipídicos termossensíveis, além de ser rápida, simples e de menor custo (TEIXEIRA et al., 2002). Entretanto, esta técnica apresenta como desvantagem a utilização de solventes orgânicos na obtenção de nanoestruturas (KELMANN et al., 2007). A viscosidade do núcleo oleoso, o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos tensoativos e a miscibilidade do solvente orgânico com a água representam parâmetros importantes na determinação da qualidade da nanoemulsão final obtida pelo processo de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004).

Propriedades físico-químicas

Dentre as principais propriedades dos sistemas multifásicos encontram-se o diâmetro e a distribuição de gotículas da fase interna. Nanoemulsões apresentam geralmente uma distribuição unimodal e diâmetro médio compreendido entre 100 e 300 nm (HASKELL et al., 1998). Várias metodologias têm sido empregadas com o propósito de avaliar o diâmetro de gotícula de nanoemulsões, sendo que o valor esperado é o principal critério para a seleção do método a ser utilizado (WESTESEN E WEHLER, 1993). A técnica de espalhamento de luz dinâmico é a principal destas metodologias empregadas (BENITA e LEVY, 1993; TIAN e LI, 1998). Diversos fatores podem influenciar a distribuição e o diâmetro médio de gotícula de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos, como a composição das formulações e as condições experimentais utilizadas nas metodologias de preparação (CHUNG et al., 2001; ISHII et al., 1990; JUMAA e MÜLLER, 1998).

Considerando a bem documentada influência dos constituintes do filme interfacial no diâmetro de nanoestruturas, estudos relativos à otimização do diâmetro de gotícula de nanoemulsões, em função da adição de concentrações crescentes de tensoativos catiônicos, têm sido realizados. Kim et al. (2001) demonstraram a influência da adição do lipídeo catiônico DOTAP no diâmetro de gotícula de nanoemulsões. Foram preparadas diversas formulações constituídas de um núcleo oleoso de esqualeno estabilizadas por concentrações crescentes de DOTAP (3 a 30 mg/mL). Nas mesmas condições de homogeneização por ultra-som, os resultados demonstraram que o diâmetro de gotícula das formulações diminui à medida que se aumenta a concentração de DOTAP até 24 mg/mL (~260 a 130 nm), sendo que a partir desta concentração o diâmetro atinge um platô, sem apresentar uma redução suplementar do diâmetro de gotícula. Além disso, os autores relacionaram o maior diâmetro das nanoemulsões obtidas com menores concentrações de DOTAP (até 9 mg/mL) com a instabilidade do sistema em função do tempo e em presença de meio tampão fosfato. Ainda, no trabalho de Martini et al. (2007) foi observado que a adição de quantidades crescentes de lipídeo catiônico levou ao aumento do tamanho de gotícula até um ponto máximo onde a carga

de superfície das gotículas se encontra próximo da neutralidade, sugerindo uma influência sobre a estabilidade físico-química das nanoemulsões.

A associação de ácidos nucléicos com nanoemulsões catiônicas também pode influenciar o diâmetro e distribuição das gotículas, podendo conduzir à desestabilização do sistema. Contudo, a formação de agregados da fase interna das nanoemulsões tem sido relacionada principalmente com a associação de elevadas concentrações de ácidos nucléicos (HARA et al., 1997; KIM et al., 2002; LIU et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2001b). De maneira geral, estudos preliminares prevêm uma zona de concentração na qual o ácido nucléico veiculado não interfere na estabilidade da estrutura coloidal (BIVAS-BENITA et al., 2004; OTT et al., 2002; SILVA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2003). Uma relação de cargas positiva é geralmente utilizada, ou seja, um excesso de carga positiva aportada pelos lipídeos catiônicos em relação aos grupamentos fosfato dos ácidos nucléicos. Trimaille et al. (2003) descrevem, entretanto, a manutenção do diâmetro de gotícula de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos e DNA mesmo em relações de carga negativas, após uma passagem por uma zona de agregação das gotículas da fase interna, na qual a estabilidade das nanoemulsões seria assegurada pela repulsão eletrostática dos ácidos nucléicos adsorvidos na interface O/A.

O uso de microscopia tem sido utilizado para avaliar o diâmetro de gotícula de nanoemulsões, incluindo a transmissão ou a criofatura (BENITA e LEVY, 1993; HASKELL, 1998). Nos trabalhos de Kim et al. (2003) e Martini et al. (2007) foram detectados diâmetros de gotícula de cerca de 200-300 nm por microscopia eletrônica de transmissão (MET), corroborando os resultados observados por espalhamento de luz dinâmico. No que se refere à morfologia, nanoemulsões catiônicas geralmente apresentam-se como gotículas esféricas (BOUCHEMAL et al., 2004), contudo, foram previamente descritas estruturas do tipo cromatina (KIM et al., 2003) e tipo bolsa de mão (TEIXEIRA et al., 2001b). Recentemente, Lee et al. (2005) observou por MET a condensação do DNA pelo uso de quitosana, uma vez que houve uma grande redução do tamanho das gotículas após a adição de quitosana. Em todos estes trabalhos o agente de contraste negativo utilizado é o acetato de uranila 2%.

A avaliação da viscosidade de nanoemulsões tem sido pouco descrita na literatura, contudo, essa propriedade reveste-se de especial importância no desenvolvimento de nanoemulsões de uso parenteral, para as quais uma elevada viscosidade pode representar uma limitação no momento da administração. Diferentes parâmetros como a concentração da fase interna (JUMAA e MÜLLER, 1998), o diâmetro de gotícula (SILVA et al., 2006; SILVANDER et al., 2003,) e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (CHUNG et al., 2001; JUMAA e MÜLLER, 1998) podem influenciar a viscosidade de nanoemulsões. As nanoemulsões líquidas apresenta geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano (ISHII et al., 1990; ROLAND et al., 2003; SILVANDER et al., 2003).

A avaliação da carga de superfície das nanoemulsões utilizadas como vetores de ácidos nucléicos tem sido correntemente descrita. A determinação do potencial zeta reflete a composição da interface das nanoemulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A determinação do potencial zeta é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Um elevado valor de potencial zeta em módulo ($> 30\text{mV}$) é importante para a estabilidade físico-química das emulsões, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações da fase interna (BENITA e LEVY, 1993; KLANG e BENITA, 1998; ROLAND et al., 2003).

Em estudo recente, Martini et al. (2007) demonstrou que a adição de quantidades crescentes de lipídeos catiônicos aumenta progressivamente o potencial zeta até atingir um platô, sugerindo uma saturação da interface O/A causada pelo lipídeo catiônico. Recentemente Rabinovich-Guilatt et al. (2004) demonstrou que valores constantes de potencial zeta obtidos para nanoemulsões catiônicas contendo diferentes concentrações do lipídeo catiônico oleilamina (OA) é um resultado da redução da ionização devido ao elevado pH da interface nesse tipo de sistema.

Apesar dos estudos de associação de polinucleotídeos com nanoemulsões catiônicas serem realizados geralmente em excesso de carga positiva, cujo potencial

zeta permanece inalterado (BARUT et al., 2005; TEIXEIRA et al., 1999), estudos relativos à caracterização do potencial zeta de nanoemulsões em função da concentração de ácido nucléico têm sido recentemente descritos na literatura (MIN et al., 2005; OTT et al., 2002; YI et al., 2000; YOO et al., 2004). Geralmente, os experimentos são realizados com a adição de concentrações crescentes de DNA, em solução aquosa, a nanoemulsões de concentração conhecida de lipídeo catiônico. O potencial zeta positivo decresce progressivamente até valores negativos, indicando a associação dos ácidos nucléicos com a interface das nanoemulsões. Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões também têm sido descritos quando a relação de carga [+/-] aproxima-se da unidade, uma vez que os fenômenos de repulsão das gotículas da fase interna tornam-se reduzidos para os complexos formados nessa relação de cargas (TRIMAILLE et al., 2003; MIN et al., 2005).

O pH das nanoemulsões catiônicas está geralmente situado em valores próximos a 7,4, principalmente por razões fisiológicas. A avaliação do pH de nanoemulsões tem sido correntemente descrita no monitoramento da estabilidade de nanoemulsões lipídicas. O ajuste do pH de nanoemulsões catiônicas com ácidos diluídos tem sido descrito para formulações compostas de lipídeos catiônicos que apresentam na sua estrutura química grupamentos aminas primárias como a EA (TEIXEIRA et al., 1999, 2001a, 2003) e a OA (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004). De fato, o pH final das nanoemulsões pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface. Relatos da redução da ionização do lipídeo catiônico OA ($pK \sim 10$) têm sido descritos para nanoemulsões em valores de pH alcalinos (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004), podendo assim reduzir os sítios de interação da interface para a associação dos ácidos nucléicos.

A associação dos ácidos nucléicos com nanoemulsões catiônicas tem sido investigada através de diferentes metodologias. Alguns estudos têm como foco a comprovação indireta da associação, seja através das modificações das propriedades físico-químicas das nanoemulsões (i.e. potencial zeta e diâmetro de gotícula) ou na avaliação da estabilidade do complexo formado. Outros avaliam o retardamento da

migração do DNA em gel de agarose por eletroforese (BARUT et al., 2005; KIM et al., 2005; YI et al., 2000). A avaliação da associação do DNA com nanoemulsões é geralmente determinada experimentalmente utilizando-se diversas razões entre o lipídeo catiônico e o ácido nucléico. O gel é feito de agarose, um polímero natural, formando uma malha através da qual o DNA, caso esteja livre, pode migrar. Este gel geralmente é utilizado na concentração de 1%. O complexo selecionado é aquele que não apresenta nenhuma banda característica de migração de DNA livre no gel de agarose, indicando a associação de 100% do DNA com a nanoemulsão (HUNG et al., 2005; KIM et al., 2002; MIN et al., 2005; YI et al., 2000).

Citotoxicidade

A avaliação da toxicidade celular é uma etapa fundamental prévia para a realização de estudos de transfecção. De fato, é necessária a determinação da faixa de concentração do reagente de transfecção que se pode utilizar sem que este apresente toxicidade intrínseca. Na literatura está descrito que valores de viabilidade celular entre 70 e 80% são aceitáveis para a segurança de vetores de transferência gênica (HUNG et al., 2005; KIM et al., 2002; YOO et al., 2004).

A citotoxicidade é associada com a natureza catiônica dos vetores, a qual é principalmente determinada pela estrutura do seu grupo hidrofílico. A porção polar geralmente consiste de aminas primárias, secundárias ou terciárias, ou ainda de sais de amônio quaternário, contudo, grupos guanidino e imidazol já foram testados (HEYES et al., 2002). Os lipídeos catiônicos podem tornar-se citotóxicos através da interação com enzimas como a proteína quinase C (BOTTEGA e EPAND, 1992).

O braço espaçador dos lipídeos catiônicos também pode influenciar a toxicidade dos mesmos. Na maior parte dos casos, esses são compostos de ligações éter, éster ou amida. Embora os compostos com éter apresentem melhor eficiência de transfecção, eles são muito estáveis para serem biodegradados, logo causam toxicidade. Lipídeos catiônicos com grupo éster, como DOTAP, são biodegradáveis e,

portanto, associados com menor citotoxicidade em células em cultura (CHOI et al., 2001), mas estes com ligantes éster ou amida são suscetíveis a degradação no sistema circulatório (LV et al., 2006).

Os sistemas lipídicos catiônicos têm na toxicidade o principal obstáculo para o seu emprego. A fim de superar este problema muitos compostos catiônicos novos têm sido desenvolvidos. A eficiência de transfecção destes sistemas de liberação *in vitro*, em parte, é determinada pela estabilidade e tamanho de gotícula dos mesmos. A toxicidade destas moléculas positivamente carregadas pode vir de uma interação direta dos componentes da formulação com as membranas celulares. Tem sido demonstrado que polycations, que se ligam à superfície negativamente carregada das membranas celulares de mamíferos, podem causar neutralização de cargas, distorção celular, lise e aglutinação. Ainda mais, polycations também podem se ligar ao núcleo celular e membranas internas e interferir em enzimas e na função celular. Além disso, a toxicidade destas moléculas pode ser uma consequência da estimulação do sistema imune (BRAZEAU et al., 1998). Na tabela 2 estão descritos os ensaios de citotoxicidade utilizados para avaliar a toxicidade de complexos pDNA/nanoemulsões.

Tabela 2. Estudos de citotoxicidade pDNA-nanoemulsões/método de avaliação.

DNA	Célula	Resultado/ Ensaio	Referência
pEGFP-C1	HeLa Hep G2 CHO	Aumento da concentração de lipídeo catiônico (DC-Chol) aumenta a citotoxicidade/ MTT	Choi et al., 2004
pCMV- β	COS-1	Presença tensoativos não-iônicos (DOPE, tween 80, Span 80, série Brij, Montanide 80) aumenta a citotoxicidade/ MTT	Kim et al., 2002
pCMV-luc	B16F10 Hep3B H1299 HeLa COS-1	Óleos de maior densidade (lipiodol, esqualeno e mistura dos dois) aumentam a citotoxicidade/ MTT	Yoo et al., 2004
pCMV- β	COS-1 CV-1	O núcleo oleoso esqualeno apresenta toxicidade inferior ao óleo de soja e de linhaça/ MTT	Kim et al., 2003
pV1Jns Ag85B	Callu-3	Ausência de toxicidade das nanoemulsões na faixa de concentração estudada/ Cell Titer 96 [®] Aqueous	Bivas-Benita et al., 2004
pCMV- β	CV-1 COS-1 NIH3T3 H1299	A toxicidade dos complexos ternários (DOTAP/polication/DNA) é menor do que a dos binários (DOTAP/DNA)/ MTT	Kim et al., 2005
pCMV-LacZ	COS-1 A549 HaCaT	Aumento da concentração de lipídeo catiônico (DOTAP) aumenta a citotoxicidade. Os co-tensoativos DOPE e COL apresentam menor toxicidade que Tween 80, Tween 20, PEI e EA/ MTT	Hung et al., 2005
pCMV-luc	COS-1	A presença de PEG-NHS com a PEI reduz a toxicidade do complexo/ MTT	Hong et al., 2004
pSV- β -Gal	SF-767	O sistema de lipoproteína é menos tóxico que lipossoma comercial/ MTT	Pan et al., 2003

A toxicidade destes sistemas lipídicos catiônicos, em parte, resulta do tamanho elevado dos complexos e do alto potencial zeta positivo requerido para sua penetração celular. A toxicidade é normalmente estreitamente associada com a razão de cargas lipídeo catiônico/DNA, bem como com a dose dos lipoplexos administrados. Razões de carga mais elevadas são geralmente mais tóxicas a uma variedade de tipos celulares, sendo que a toxicidade é um parâmetro célula-específico (LV et al., 2006).

Como pode ser observado na tabela 2, as técnicas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade são colorimétricas, entre elas, o ensaio com sal de tetrazólio brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) e os kits comerciais. O ensaio de MTT é amplamente utilizado para quantificar, através de ensaio colorimétrico, a citotoxicidade de preparações. Os sais de tetrazólio são metabolicamente reduzidos a produtos finais corados, denominados cristais de azul de formazan, pelo sistema enzimático succinato-tetrazólio redutase, o qual pertence a cadeia respiratória mitocondrial e é ativo apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). Por sua vez, o kit comercial *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* utiliza um novo composto tetrazólio, chamado 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS), o qual em combinação com etosulfonato de fenazina (PES) um reagente de acoplamento de elétrons, produz uma mudança colorimétrica. O uso de kit comercial tem como principal vantagem a maior rapidez da realização da reação colorimétrica.

Um estudo de Choi et al. (2004) com nanoemulsão catiônica composta por óleo de rícino, DOPE, Tween 80 e DC-Chol como lipídeo catiônico descreve que a citotoxicidade de células transfectadas pode ser influenciada pelo aumento da quantidade de lipídeo catiônico (DC-Chol). Todos os complexos lipídeo/DNA apresentaram baixa toxicidade (em torno de 80% de viabilidade celular) e a presença de soro leva a um aumento na viabilidade celular (~90%). No trabalho de Hung et al. (2005) também se verifica que a quantidade de lipídeo catiônico empregada deve ser otimizada para que a nanoemulsão catiônica não seja citotóxica, pois o aumento da quantidade de lipídeo catiônico conduz a um aumento da toxicidade.

Nas formulações de nanoemulsões catiônicas têm sido correntemente descrito o uso de tensoativos não-iônicos como co-emulsificantes. No trabalho de Kim et al. (2002) observa-se que as formulações contendo tensoativos não-iônicos (Tween 80, Span 80, Montanide 80 e a série Brij) são mais tóxicas que sem os mesmos, porém a toxicidade encontrava-se numa faixa tolerável (abaixo de 20%) e formulações contendo

DOTAP/DOPE/Tween 80 parecem mais tóxicas que as formulações DOTAP/DOPE, mas esta toxicidade parece relacionada com o aumento da razão lipídeo catiônico/DNA.

No trabalho de Hung et al. (2005) também é feita à avaliação do uso de diferentes co-emulsificantes na citotoxicidade e eficiência de transfecção de nanoemulsões catiônicas. De acordo com este estudo, dependendo do tipo de co-emulsificante diferentes fenômenos podem ser observados. O uso de EA e polietilenimina (PEI), que são compostos catiônicos, leva a redução da viabilidade, já DOPE e colesterol (COL) apresentam boa tolerância.

Muito embora os lipídeos catiônicos sejam considerados importantes nos estudos de citotoxicidade, o núcleo oleoso é um constituinte essencial das emulsões lipídicas. É evidenciado por vários estudos que as propriedades físico-químicas, bem como a estabilidade e a viscosidade das emulsões é determinada pela mudança do núcleo oleoso (CHUNG et al, 2001). Yoo et al. (2004) demonstraram que o uso de um óleo de elevada densidade, lipiodol, na ausência de soro é muito tóxico (ensaio de MTT) isto pelo fato de que sua elevada densidade permite um maior contato com células aderentes, porém na presença de soro essa toxicidade reduz drasticamente. Os autores explicam que isto ocorre pelo fato de que sem soro não há fatores de crescimento, os quais são essenciais para a sobrevivência das células. Assim a utilização de um óleo de alta densidade na presença de soro e numa razão DOTAP/DNA igual a 4, a citotoxicidade é tolerada e a eficiência de transfecção é aumentada. No estudo de Kim et al. (2003) foram testados os óleos esqualeno, de soja e de linhaça. O primeiro se mostrou o menos tóxico tanto na presença quanto na ausência de soro, justificado pelo fato que este óleo aumenta a estabilidade das nanoemulsões catiônicas.

Apesar do fato de muitas formulações lipídicas catiônicas demonstrarem boa eficiência de transfecção, sua aplicação têm sido limitada *in vitro* e, especialmente *in vivo*, devido a sua toxicidade intrínseca, causada principalmente pelos lipídeos catiônicos. Em contrapartida a condensação prévia do DNA com policátions como

sulfato de protamina, espermina e poli-l-lisina, conduz a um aumento da eficiência de transfecção. Esses resultados também foram relacionados com a menor citotoxicidade dos complexos ternários, lipídeo catiônico/polication/DNA, do que os complexos binários lipídeo catiônico/DNA (KIM et al., 2005).

Um outro tipo de sistema lipídico empregado na liberação de genes consiste na adição de polímeros. No trabalho de Hong et al. (2004) é empregado o ensaio de MTT para verificar a redução da citotoxicidade de um sistema lipídico composto por PEI, utilizando lipídeo polietilenoglicol N-hidroxisuccinimidil (PEG-NHS). A elevada carga catiônica do polímero PEI freqüentemente resulta em alta toxicidade, um dos maiores fatores limitantes do seu uso *in vivo*. Com isso, vários esforços têm sido feito para minimizar este efeito por meio de ligação covalente de polímeros não-iônicos e hidrofílicos como PEG, transferrina e poli [N-(2-hidroxipropil) metacrilato]. Quanto maior a razão PEI/DNA maior a toxicidade. Somente PEI é tóxico devido ao grupo amino protonado. PEI/PEG/DNA apresenta menor toxicidade que só PEI/DNA, ou seja, a peguilação reduz a citotoxicidade.

Diversos autores têm descrito a toxicidade dos complexos formados entre lipossomas catiônicos e DNA. Desta forma, atualmente, outros sistemas carreadores de genes têm sido propostos e investigados. Uma das abordagens é o desenvolvimento de um sistema de liberação de genes que de alguma forma mimetiza carreadores naturais do corpo humano. Pan et al. (2003) descreve o uso de um sistema baseado em uma lipoproteína artificial. Neste trabalho fica evidenciado que a eficiência de transfecção desse novo sistema é similar a de um lipossoma comercial, mas muito menos citotóxico.

Estudos de transfecção

Diversos sistemas não-virais baseados no uso de lipídeos catiônicos têm sido empregados como sistemas de transfecção de genes. Geralmente, estes sistemas são encontrados na forma de lipossomas catiônicos (CHANG et al., 2004; TRIMAILLE et al., 2003). Contudo, essas nanoestruturas apresentam geralmente baixa estabilidade na presença de quantidades pequenas de soro. Esse fenômeno tem sido atribuído à neutralização das cargas positivas disponíveis nos complexos, as quais são essenciais para ligação do complexo lipídio/DNA na superfície das células. Ainda, os lipossomas, formam agregados e a sua eficiência de transfecção tem sido considerada reduzida (LIU et al., 1996; YI et al., 2000).

Diversas vezes na literatura encontra-se descrita a propriedade de maior resistência das nanoemulsões catiônicas frente aos componentes do soro, sendo esta uma grande vantagem quando a transfecção é feita em meio contendo soro, como na aplicação *ex vivo*. Uma das razões para possuírem essa propriedade deve ser a estabilidade do complexo emulsão/DNA. Além disso, também foi demonstrado que emulsões catiônicas contendo DOTAP apresentam estabilidade contra a descomplexação do DNA quando em presença do ácido poli-L-aspártico (PLAA) e proteção do DNA frente à digestão por DNase I, o que não foi observado no caso dos lipossomas em estudo (YI et al., 2000).

De maneira geral, a literatura da área relata que quanto maior a concentração de lipídeo catiônico, como o DOTAP, menor é o tamanho de partícula e maior é o potencial zeta das nanoemulsões catiônicas. Assim, uma maior atividade de transfecção pode ser obtida, até uma determinada concentração ótima. É sugerido que a estabilidade do carreador é um pré-requisito necessário para formação de complexos estáveis com DNA, e que a estabilidade do complexo parece estar correlacionada com a atividade de transfecção *in vivo*. Por outro lado, Kim et al. (2003) relatam que o complexo entre nanoemulsões catiônicas e pDNA é mais estável quando o mesmo é formado por partículas menores.

Para formação do complexo as moléculas de DNA precisam ligar-se à superfície das partículas das emulsões através de interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupamentos fosfato do DNA e as cargas positivas dos lipídeos catiônicos. Funcionando como um polímero aniônico, uma molécula de DNA deve ligar-se a mais de uma partícula da emulsão formando agregados. A formação destes agregados é provavelmente facilitada se as cargas positivas da superfície das partículas estão acessíveis. Entretanto, a formação destes agregados pode não ocorrer se houverem estruturas na superfície que previnam estericamente a ligação de uma molécula de DNA a mais de uma partícula de emulsão. Assim sendo, acredita-se que tensoativos não iônicos apresentando cadeias de polioxietileno em sua estrutura como a série dos polissorbatos estabiliza estericamente a estrutura, sem, contudo interferir na chegada do DNA à interface (HARA et al., 1997; LIU et al., 1996).

No estudo de Liu et al. (1996), todas as formulações das nanoemulsões testadas com diferentes tensoativos não-iônicos e o lipídio catiônico DC-Chol, com exceção da que continha Brij 700 apresentaram alta atividade de transfecção na ausência de soro. Na presença de soro, entretanto, a atividade de transfecção de cada formulação variou significativamente. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o tamanho da partícula dos complexos emulsão/DNA e a sua habilidade de transfectar células é dependente da concentração do tensoativo não-iônico na formulação. Além disso, foi sugerido que a estrutura da porção hidrofílica dos tensoativos não-iônicos na emulsão é importante para determinar como as moléculas de DNA interagem com as emulsões e a extensão na qual o DNA é transferido para o interior das células.

Kim et al. (2000) foi um dos primeiros a propor uma emulsão O/A catiônica contendo DOTAP, DOPE e fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (PE-PEG) como um carreador efetivo de genes *in vivo*. A incorporação do lipídio DOPE foi feita pela sua conhecida propriedade fusogênica, facilitando o escape endossomal e assim, aumentando a atividade de transfecção *in vitro* e *in vivo*, como demonstrado por Felgner et al. (1994) para lipossomas. No referido estudo foi demonstrado que esta emulsão catiônica foi capaz de liberar um pDNA na presença de 90% de soro *in vitro* e

também de liberar com sucesso o mesmo plasmídeo nas células do epitélio nasal de ratos *in vivo*. E ainda foi verificado que a atividade de transfecção foi superior do que com o uso de lipossomas comerciais.

A incorporação de PE-PEG é uma maneira de superar o problema da instabilidade na presença de soro e de prolongar o tempo de circulação dos complexos no sangue, isto pelo fato de fornecer uma barreira para as cargas positivas e por gerar uma superfície mais hidrofílica (CHESNOY et al., 2001). Em um estudo de Yi et al. (2000) foi adicionado PE-PEG₂₀₀₀ para aumentar a estabilidade física da formulação, pois os lipídeos-PEG criam uma barreira estérica e previnem a agregação das partículas lipídicas induzida pelo DNA.

Na mesma linha, Liu et al. (1996) demonstraram que tensoativos não-iônicos apresentam diferentes funções nas emulsões, entre elas, bloqueio do aumento do tamanho das partículas da emulsão pelo DNA, influência na atividade de transfecção e resistência ao efeito de inibição dos componentes do soro. Entretanto, o uso de tensoativos não-iônicos pode diminuir a interação das nanoemulsões com o DNA e afetar a transfecção, dependendo do tamanho da cadeia e do conteúdo de PEG no tensoativo (HUNG et al., 2005; KIM et al., 2002). Aumentando a fração hidrofílica do Tween (20 à 80) ou do Span (20 à 80) foi aumentada a liberação do DNA do complexo (dissociação), indicando que o PEG no tensoativo não-iônico inibe a interação eletrostática entre o DNA e a emulsão, por exercer obstáculo estérico. Com isso, foi sugerido nesse estudo que é necessária uma detalhada otimização do conteúdo de PEG nas formulações a fim de que este tensoativo não influencie negativamente na eficiência de transfecção.

Em dois estudos recentes foi verificada a expressão aumentada e prolongada da *Green Fluorescent Protein* (GFP), em células Hep G2 utilizando plasmídeos que possuem o gene que codifica para esta proteína e uma nanoemulsão composta por óleo de rícino, DOPE, Tween 80 e DC-Chol como lipídio catiônico (CHOI et al., 2004; MIN et al., 2005). Nestes estudos ficou evidenciado que o aumento da concentração do

lipídeo catiônico aumenta a eficiência da transfecção até uma concentração ideal corroborando com outros trabalhos como o de Kim et al. (2003) e, além disso, nos referidos estudos observa-se a maior atividade de transfecção das nanoemulsões quando comparadas com lipossomas e a obtenção de uma expressão gênica prolongada com esse sistema carreador.

Recentemente, um estudo de Bivas-Benita et al. (2004), demonstrou que após 48 horas da administração de uma emulsão catiônica submicrométrica contendo fosfatidilcolina (PC), poloxâmico e o lipídeo catiônico estearilamina, a expressão da proteína GFP foi detectada em células Calu-3. Os achados sugerem que o DNA foi liberado do compartimento endolisossomal, penetrou no núcleo e resultou na expressão da proteína. Foi previamente demonstrado que os lipídeos catiônicos desestabilizam a membrana lisossômica *in vitro*, provavelmente pela interação com lipídeos aniônicos da membrana lisossomal e induzem a fusão entre as bicamadas lipídicas.

O trabalho de Yoo et al. (2006) é o primeiro relato da utilização de nanoemulsões catiônicas como vetores de um gene terapêutico, o gene da pró-insulina, para o tratamento da diabetes mellitus tipo 1. A nanoemulsão catiônica empregada foi composta pelo lipídeo catiônico DOTAP. Neste trabalho foi demonstrada a redução dos níveis de glicose a níveis normais por sete dias em camundongos fêmea C57BL/6 com diabetes mellitus dependente de insulina. Entretanto, o aumento dos níveis de glicose após sete dias é justificado pelos autores, como uma resposta imune, uma vez que, são realizadas múltiplas injeções e trata-se do uso de uma proteína transgênica.

A liberação de vacinas de DNA nas mucosas das vias aéreas seria um método ideal de imunização. Entretanto, existem poucos relatos de um sistema de liberação gênico satisfatório para esta aplicação. No estudo de Kim et al. (2006) foi utilizada uma nanoemulsão catiônica para imunizar camundongos pela via intranasal com um plasmídeo, pCMV-S, codificando para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). A complexação do pDNA com a nanoemulsão catiônica contendo DOTA/DOPE aumentou significativamente a expressão do antígeno HBsAg tanto no

tecido nasal quanto pulmonar. Além disso, foi associado com aumento nos níveis de anticorpos específicos HBs no soro e nos fluidos da mucosa.

Baseado no fato de que a quitosana, um polissacarídeo catiônico natural, é capaz de formar um complexo iônico com DNA, no qual o DNA é condensado e assim protegido da degradação por nucleases, o grupo de Lee et al. (2005) utilizou uma nanoemulsão catiônica contendo DC-Chol e DOPE já testada, mostrando previamente eficiência de transfecção e baixa toxicidade agora adicionada de quitosana para aumentar a eficiência de transfecção. Neste trabalho fica demonstrado que a adição de quitosana leva à redução do tamanho dos complexos, devido à condensação que esta promove, bem como expressão prolongada do gene adicionado, sugerindo que o uso de quitosana aumenta a eficiência de transfecção *in vitro* e estende a transferência gênica *in vivo*.

Existem diversas maneiras de se determinar a eficiência de transferência gênica, sendo que a escolha do melhor método depende da disponibilidade de recursos do laboratório e dos sistemas em teste (JEYASEELAN et al., 2001). O mais comum nos estudos que envolvem transfecção é o uso de genes repórteres, os quais são inseridos em plasmídeos, a fim de se quantificar o ácido nucléico que se espera que tenha sido internalizado nas células. Os genes repórteres geralmente codificam para uma proteína ou enzima específica, a qual é ausente na linhagem celular testada e pode ser facilmente detectada. Existe uma variedade de sistemas de genes repórteres que foram estabelecidos para medir expressão gênica. Estes incluem os genes que codificam para as enzimas cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase de vaga-lume e β -galactosidase (JEYASEELAN et al., 2001), além da proteína GFP (KAIN et al., 1995).

A atividade da CAT nos lisados celulares é determinada ou pela auto-radiografia da cromatografia em camada delgada ou pela leitura da radioatividade com um analisador de imagem específico. A atividade da CAT é expressa como a atividade relativa baseada no percentual de conversão dos cloranfenicóis acetilados em cloranfenicóis totais utilizando cloranfenicol com ^{14}C marcado como substrato

(JEYASEELAN et al., 2001; KIM et al., 2000; YI et al., 2000). No ensaio com a enzima luciferase ocorre uma reação luminescente catalisada pela mesma. O equipamento utilizado é um luminômetro, sendo que o pico de emissão de luz é medido por 20 segundos à temperatura ambiente (CHOI et al., 2002; HARA et al., 1997; KIM et al., 2001, 2003, 2005; LIU et al., 1996; YOO et al., 2004). O método para medir a atividade da β -galactosidase é uma reação colorimétrica com leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm (PAN et al., 2003) ou em 580 nm (CHUNG et al., 2001; FELGNER et al., 1994; KIM et al., 2001, 2002, 2003, 2005) ou em 595 nm (HUNG et al., 2005).

Um gene repórter que vem sendo correntemente utilizado nos estudos de transfecção é o gene que codifica para a proteína GFP (KAIN et al., 1995). A proteína GFP foi extraída da água-viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 2005) e emite luz verde brilhante (comprimento de onda máximo de 509 nm) quando excitada com luz UV ou azul (comprimento de onda máximo de 395 nm). Diferente de outros repórteres bioluminescentes, o cromóforo no GFP é intrínseco à estrutura primária da proteína e a fluorescência da GFP não requer um substrato ou cofator. A fluorescência da GFP é estável, independente de espécie e pode ser monitorada não invasivamente em células vivas (ESCRIOU et al., 1998; KAIN et al., 1995). Os níveis de GFP podem ser avaliados por citometria de fluxo e/ou microscopia confocal (BIVAS-BENITA et al., 2004; CHOI et al., 2004; LEE et al., 2005; MIN et al., 2005).

Além da detecção da presença ou atividade da proteína, a eficiência de transferência pode ser medida em relação aos níveis de expressão gênica (número de cópias de mRNA que são transcritas para o gene de interesse) ou em relação à quantidade de DNA diretamente transferida para a célula (número de cópias do pDNA). Em ambos os casos, a detecção é baseada na detecção de seqüências específicas através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Atualmente a técnica de PCR em tempo real é a metodologia mais inovadora no âmbito da análise de expressão gênica. Os processos de amplificação e detecção ocorrem simultaneamente no mesmo tubo de reação. Além disso, mediante a detecção

por fluorescência se pode medir durante a amplificação a quantidade de DNA sintetizado em cada momento, já que a emissão de fluorescência produzida na reação é proporcional à quantidade de DNA formado. As vantagens desta técnica são a sua sensibilidade e especificidade, sem risco de contaminação, facilidade de realização e rapidez (COSTA, 2004; ESPY et al., 2006; JEYASEELAN et al., 2001; KUBISTA et al., 2006).

Os sistemas de detecção por fluorescência empregados na PCR em tempo real podem ser de dois tipos, agentes intercalantes ou sondas específicas marcadas com fluorocromos e desenhadas de maneira especial (COSTA, 2004; ESPY et al., 2006; JEYASEELAN et al., 2001; KUBISTA et al., 2006).

Agentes intercalantes são fluorocromos que aumentam muito a intensidade de emissão de fluorescência quando se unem ao DNA dupla-fita. O mais empregado em PCR em tempo real é o *SYBR Green*. As sondas de hibridização específicas são sondas marcadas com fluorocromos, um doador e um receptor. O processo se baseia na transferência de energia fluorescente mediante ressonância (FRET). As sondas podem ser de hidrólise, também chamadas sondas TaqMan[®] (Applied Biosystems), *molecular beacons* e ainda as sondas FRET. Em todos esses sistemas de sondas de hibridização, o incremento de DNA em cada ciclo corresponde a um aumento na hibridização das sondas, o que corresponde a um aumento de mesma proporção da fluorescência emitida (COSTA, 2004; ESPY et al., 2006; JEYASEELAN et al., 2001; KUBISTA et al., 2006).

A quantificação do ácido nucléico na amostra é realizada através do uso de um programa de informática, o qual calcula o número do ciclo em que o leitor começa a detectar um incremento significativo de fluorescência, com respeito ao sinal de base. O ciclo limite no qual um aumento estatisticamente significativo na fluorescência é primeiramente detectado pelo sistema de detecção se denomina Ct (*threshold cycle*) e este é inversamente proporcional à concentração inicial de DNA na amostra (COSTA, 2004; ESPY et al., 2006; JEYASEELAN et al., 2001; KUBISTA et al., 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materials

Ácido nucléico

- Plasmídeo pTracerTM-CMV2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA), o qual contém o gene de resistência GFP-ZeocinTM sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV) e o gene de resistência à ampicilina.

Matérias-Primas

- DOPC (1,2-dioleil-3-fosfatidilcolina) (Lipoid AG, Alemanha);
- DOPE (1,2-dioleil-3-fosfatidiletanolamina) (Lipoid AG, Alemanha);
- DSPC (1,2-diestearil-3-fosfatidilcolina) (Lipoid AG, Alemanha);
- DSPE (1,2-diestearil-3-fosfatidiletanolamina) (Lipoid AG, Alemanha);
- EA (estearilamina) (Sigma, EUA);
- Glicerol (Merck, Alemanha);
- Lecitina de gema de ovo (LIPOID E-80®) (Lipoid AG, Alemanha);
- Triglicerídeos de cadeia média (cáprico/caprílico) (Lipoid AG, Alemanha).

Aparelhos e Equipamentos

- ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA);
- Agitador magnético TE-085 (Tecnal, Brasil);
- Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Suíça);
- Banho com sistema de refrigeração (B. Braun, International, Alemanha);
- Bomba de vácuo VAC[®] V-500 (Büchi, Labortechnik AG, Suíça);
- Centrífuga Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Alemanha);
- Espectrofotômetro de varredura (Hewlett-Packard 8452A);
- Estufa de CO₂ - CO₂ Water Jacketed Incubator (NuairTM US Autoflow);
- Evaporador rotatório Büchi B-480 (Büchi, Flawil, Suíça).
- Leitora de placas de ELISA (Hantos, Alemanha);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Japão);

- Potenciômetro B474, (Micronal, Brasil);
- Quantificador de DNA – GeneQuant (Pharmacia Biotech, USA);
- Tensiômetro Krüss K8600 (Hamburgo, Alemanha);
- Transiluminador UV (UVITEC, Inglaterra);
- Viscosímetro capilar Durchlaufzeit 20-75s (Normschliff Glasgerate, Alemanha);
- Zetasizer (Malvern, Inglaterra).

Reagentes e Solventes

- 20x Assay GFP Mix (Applied Biosystems, USA);
- 3-[4,5 Dimetiltiazol-2-il]-2,5- Brometo de Difeniltetrazólio (MTT) (USB Corp);
- Acetato de uranila P.A (Reagen, Brasil);
- Acetona P.A (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Ácido bórico P.A (Synth, São Paulo);
- Ácido clorídrico P.A (Nuclear, Brasil);
- Agarose ultrapura (Invitrogen, Espanha);
- Brometo de etídio (Pharmacia Biotech, Suécia);
- Cloreto de sódio P.A (Merck, Alemanha);
- Clorofórmio (Synth, São Paulo);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Alemanha);
- DNase I (Invitrogen, USA);
- EDTA sal dissódico P.A (Nuclear, São Paulo);
- Etanol P.A (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Fenol P.A. (Sigma-Aldrich, USA);
- Fosfato de potássio Dibásico (Synth, Brasil);
- Hidróxido de sódio P.A (Merck, Alemanha);
- Meio Essencial Mínimo (DMEM) (GIBCO, USA);
- Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO, USA);
- TaqMan[®] PCR master MIX, no AmpErase[®] UNG (2x) (Applied Biosystems, USA);
- TE (Tris-HCl/EDTA) (Promega, USA);
- Tripsina (GIBCO, USA);
- Tris (hidroximetil) amino metano P.A (Nuclear, São Paulo).

Métodos

Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea com base nas condições experimentais descritas previamente por Silva et al., 2006 e Martini et al., 2007. Nesse procedimento, os constituintes da fase oleosa e aquosa foram solubilizados em etanol e água, respectivamente. Em seguida, a fase orgânica foi lentamente vertida através de funil, sob agitação moderada e constante, sobre a fase aquosa. Após, foi realizada a retirada dos solventes até o volume desejado, através de destilação à pressão reduzida em evaporador rotatório em temperatura inferior a 50°C.

Em uma primeira etapa, foi avaliada a quantidade dos solventes utilizados na preparação das formulações. Para tanto, foram obtidos diferentes lotes utilizando-se quantidades crescentes (10/20, 20/40, 30/60, 40/80 e 50/100) dos solventes, etanol/água (mL), na proporção 1/2. Após, partindo-se da relação 30 mL de etanol e 60 mL de água (90 mL), foram preparados diferentes lotes de formulação utilizando-se diferentes volumes (10/80, 20/70, 30/60, 40/50 e 50/40) dos solventes etanol/água (mL). Esta etapa foi realizada apenas para a formulação controle composta de TCM, lecitina e água, codificada como PC, cuja composição quantitativa está apresentada na tabela 3. A relação etanol/água 30/60 foi selecionada para a obtenção das nanoemulsões nos estudos subseqüentes.

Após, partindo-se das condições de emulsificação espontânea descritas acima foram preparadas nanoemulsões catiônicas, variando-se a concentração do lipídeo catiônico estearilamina (0,02 a 20 mM). A concentração 2 mM de estearilamina foi selecionada para os estudos subseqüentes. As formulações finais foram então compostas por TCM, estearilamina, lecitina de gema de ovo ou pelos fosfolipídeos isolados (DSPC, DOPC, DSPE ou DOPE), glicerol e água. Os diferentes componentes de fase interna foram previamente solubilizados em etanol. A composição final das formulações está apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Composição final das nanoemulsões contendo os diferentes fosfolipídeos e o lipídeo catiônico estearilamina (% , p/p).

	Formulações					
	PC	PC/EA	DSPC/EA	DOPC/EA	DSPE/EA	DOPE/EA
Estearilamina	-	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Lecitina	2,00	2,00	-	-	-	-
DSPC	-	-	2,00	-	-	-
DOPC	-	-	-	2,00	-	-
DSPE	-	-	-	-	2,00	-
DOPE	-	-	-	-	-	2,00
TCM q.s.p.	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Água q.s.p.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Foram preparados lotes de 10 mL das cinco diferentes nanoemulsões catiônicas (PC/EA, DSPC/EA, DOPC/EA, DSPE/EA, DOPE/EA) em triplicata. Uma formulação controle obtida na ausência de lipídeo catiônico (PC) foi igualmente preparada. Logo após o preparo, o pH das formulações foi ajustado ao valor de 7,4 e as propriedades físico-químicas avaliadas.

Caracterização físico-química das nanoemulsões

Determinação do pH

A determinação do pH das nanoemulsões foi realizada diretamente nas formulações através da utilização de um potenciômetro calibrado com pH 4 e 7 antes e após o ajuste das nanoemulsões para pH 7,4.

Determinação do diâmetro de gotícula

As diferentes formulações foram caracterizadas em termos de diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersidade, através de espalhamento de luz dinâmico. Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 90° após adequada diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®).

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55mV (látex poliestireno carboxilato). Todas as análises foram realizadas após diluição em solução de NaCl 1mM.

Avaliação morfológica das nanoemulsões

Para avaliar a morfologia das gotículas de nanoemulsões, as diferentes formulações foram diluídas em água na proporção de 1:10 (nanoemulsão:água). Após diluição, as amostras foram adicionadas em suportes metálicos (200 mesh) de cobre com revestimento de carbono e Formvar, sendo o contraste negativo realizado com acetato de uranila a 2 %. Em seguida, as amostras foram mantidas armazenadas em dessecador a vácuo por um período de 24 horas, e então submetidas à análise através de microscopia eletrônica de transmissão.

Determinação da viscosidade

A viscosidade das formulações foi determinada através da técnica de viscosimetria capilar (viscosímetro de Ostwald- viscosímetro capilar Durchlaufzeit 20-75s, Normschliff Glasgerate, Alemanha); conforme descrita na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988). Para a determinação, transferiu-se, separadamente, um volume de

5mL de cada formulação para o viscosímetro e observou-se o tempo de escoamento da amostra através do capilar. As análises foram realizadas a uma temperatura de 20° C, em triplicata, sendo que a variação aceita entre as leituras é igual ou menor a um segundo. A viscosidade relativa foi determinada através da equação 1.

$$\eta = k.t.\rho \quad (\text{equação 1})$$

Onde: η = viscosidade absoluta (cP)

k = constante do viscosímetro

t = densidade do fluido a temperatura de 20° C (g/mL)

ρ = tempo de escoamento (s)

O valor da constante de Ostwald (k) foi determinado experimentalmente ($k = 0,0212$), medindo-se o tempo de escoamento de um líquido padrão, neste caso a água, e aplicando na fórmula acima o valor da viscosidade da água a temperatura de 20° C (1,0087 cP). Para todas as amostras, a densidade foi determinada experimentalmente, através do uso de picnômetro, sendo de 1g/mL. Os resultados foram expressos como a média de três determinações de dois lotes preparados de cada formulação.

Determinação da tensão superficial

A tensão superficial das formulações foi determinada através da utilização de um tensiômetro interfacial Krüss modelo K8600 (Hamburgo, Alemanha), pelo método do anel (*Lecomte duNoüy*), calibrado com água em aproximadamente 70mN/m.

Após calibrado, transferiu-se, separadamente, um volume de 5mL de cada nanoemulsão para o tensiômetro e abaixou-se o anel até mergulhar o mesmo na formulação. Observou-se, então, a tensão exercida pelo equipamento para romper a interface formulação/ar. As análises foram realizadas a uma temperatura de 20° C, em triplicata, sendo que a variação aceita entre as leituras é igual ou menor a 1mN/m.

Complexação plasmídeo-nanoemulsão

Obtenção do plasmídeo de DNA pTracerTM-CMV2

O plasmídeo comercialmente disponível pTracerTM-CMV2 (Invitrogen, USA) foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Brasil). A extração plasmidial foi realizada utilizando o Kit Invitrogen Maxi (Invitrogen, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi precipitado em etanol 70% e reconstituído em TE (Tris-HCl/EDTA). A concentração de DNA plasmidial foi determinada em espectrofotômetro de UV (Pharmacia Biotech, USA), no comprimento de onda de 260nm.

Complexação do plasmídeo pTracerTM-CMV2 com as nanoemulsões

Foram avaliadas concentrações crescentes das nanoemulsões produzidas, com uma quantidade fixa de DNA de maneira a formar complexos com diferentes relações de carga [+/-]. As relações de carga [+/-] testadas foram 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0. As nanoemulsões e o plasmídeo foram incubados por trinta minutos para facilitar a formação do complexo e então aplicados em gel de agarose a 1%. Como controle foi utilizado somente o plasmídeo sem nanoemulsão associada. A eletroforese foi realizada com tampão TBE (Tris-borato-EDTA) à 50mV. Brometo de etídio foi empregado para visualização das bandas no gel de agarose e a visualização foi feita através de um transiluminador de UV (UVITEC, Inglaterra). A formação de complexo entre o plasmídeo pTracerTM-CMV2 e as nanoemulsões catiônicas foi verificada através do ensaio de retenção em gel de agarose por eletroforese.

Ensaio de estabilidade dos complexos frente à enzima DNase I

A avaliação da estabilidade do complexo entre o plasmídeo pTracerTM-CMV2 e as nanoemulsões catiônicas foi verificada através do ensaio com a enzima DNase I (Invitrogen, USA). Esta enzima é capaz de digerir ácidos nucleicos e foi utilizada como

representante das nucleases do organismo humano. Após a formação dos complexos nas diferentes relações de carga [+/-], como descrito acima, estes foram incubados por trinta minutos com a enzima DNase I à 37 °C na presença de tampão para enzima. Além dos complexos foi incubado somente o pDNA, sem enzima, para verificar se as condições de reação não influenciavam no resultado e pDNA, com a enzima, para mostrar a digestão do mesmo e comprovar o bom funcionamento da enzima. Após o período de incubação todas as amostras foram submetidas à extração do DNA com fenol-clorofórmio, segundo a técnica descrita por Sambrook et al. (1989).

A verificação de que o DNA estava protegido da ação da enzima DNase I pela formação do complexo foi feita através da aplicação das amostras em gel de agarose 1%. Como controle foi utilizado somente o plasmídeo sem nanoemulsão associada. A eletroforese foi realizada com tampão TBE (Tris-borato-EDTA) à 50mV. Brometo de etídio foi empregado para visualização das bandas no gel de agarose e a visualização foi feita através de um transiluminador de UV (UVITEC, Inglaterra).

Caracterização físico-química dos complexos pDNA/nanoemulsões

A fim de avaliar a influência do plasmídeo pTracerTM-CMV2 nas propriedades físico-químicas, as nanoemulsões selecionadas foram analisadas quanto a sua morfologia, potencial zeta e diâmetro das gotículas conforme as metodologias descritas anteriormente.

Avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões com sal de tetrazólio (MTT)

A avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões foi realizada em células de hepatoma humano Hep G2 disponíveis no laboratório do Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Essas células foram cultivadas em meio de cultura mínimo essencial (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Em confluência, as células Hep G2 foram subcultivadas por tripsinização com 0,25% de tripsina estéril na razão de 1:4 a cada 4 a 5 dias.

Em um primeiro momento foi realizada a otimização do número de células a serem cultivadas nas placas de 96 poços através de uma curva de número de células x absorvância, bem como da concentração de MTT a ser utilizada e a necessidade de ajuste de pH com tampão Sorensen's glicina. As células foram então cultivadas numa densidade de 1×10^4 células/mL e incubadas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Foi realizado o ajuste do pH com o tampão Sorensen's glicina.

Após incubação das células Hep G2 com as nanoemulsões da tabela 3, em seis diferentes concentrações, durante um período de 24 horas em placas de 96 poços, o meio foi removido e substituído por 0,5 mg/mL de solução estéril de MTT. A solução de MTT foi preparada extemporaneamente em PBS 1x. As placas contendo a solução de MTT foram envolvidas em papel alumínio e colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4 horas. A solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço a fim de dissolver os cristais de azul de formazan. A densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 570 nm utilizando um leitor de placas (Hantos, Alemanha), antes e após o ajuste do pH com o tampão Sorensen's glicina.

Como controle de 100% de viabilidade celular foram utilizadas células incubadas em meio de cultura (DMEM), enquanto que 0% de viabilidade celular foi realizado após incubação das células com Triton x (2%).

Avaliação da transferência gênica por PCR em tempo real

O DNA das amostras foi extraído com o kit Easy DNA (Invitrogen, Brasil). A sonda e os primers utilizados no ensaio foram desenhados e sintetizados pela empresa Applied Biosystems através de um *Assay-by-DesignSM Service* para ensaios de expressão gênica. A sonda utilizada foi do tipo *TaqMan[®] MGB probes, FAMTM dye-labeled*. Os primers foram desenhados para o gene da GFP. A seqüência do primer *forward* foi 5'-CCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTA-3' e do primer *reverse* foi 5'-GAACGGCACTGGTCAACTTG-3'. A seqüência da sonda *TaqMan[®]* para o gene GFP foi 5'-TCCATGCCATGTGTAATC-3' e esta foi marcada com corante fluorescente FAM na extremidade 5' e NFQ na extremidade 3' como quencher.

Cada reação de PCR continha 10 uL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (2x), 1 uL de 20x Assay Mix (contendo os primers e sonda), 100 ng de pDNA ou DNA da amostra, sendo o volume final de reação 20uL. As condições de reação foram 10 minutos à 95° C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos à 95° C (desnaturação) e 1 minuto à 60° C (anelamento e extensão). Todas as reações foram realizadas em duplicata utilizando o equipamento ABI PRISM[®] 7500 SDS (Applied Biosystems, USA).

Análise estatística

Para todos os experimentos, os resultados obtidos foram avaliados através da Análise da Variância (ANOVA) e a comparação dos resultados obtidos entre as formulações foram analisados através de teste “t” de Student, considerando-se um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Otimização das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea

A figura 1 apresenta o diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade das nanoemulsões, isentas do lipídeo catiônico estearilamina (PC), em função do volume (A) e relação de volume dos solventes etanol e água (B) utilizado durante o procedimento de emulsificação espontânea.

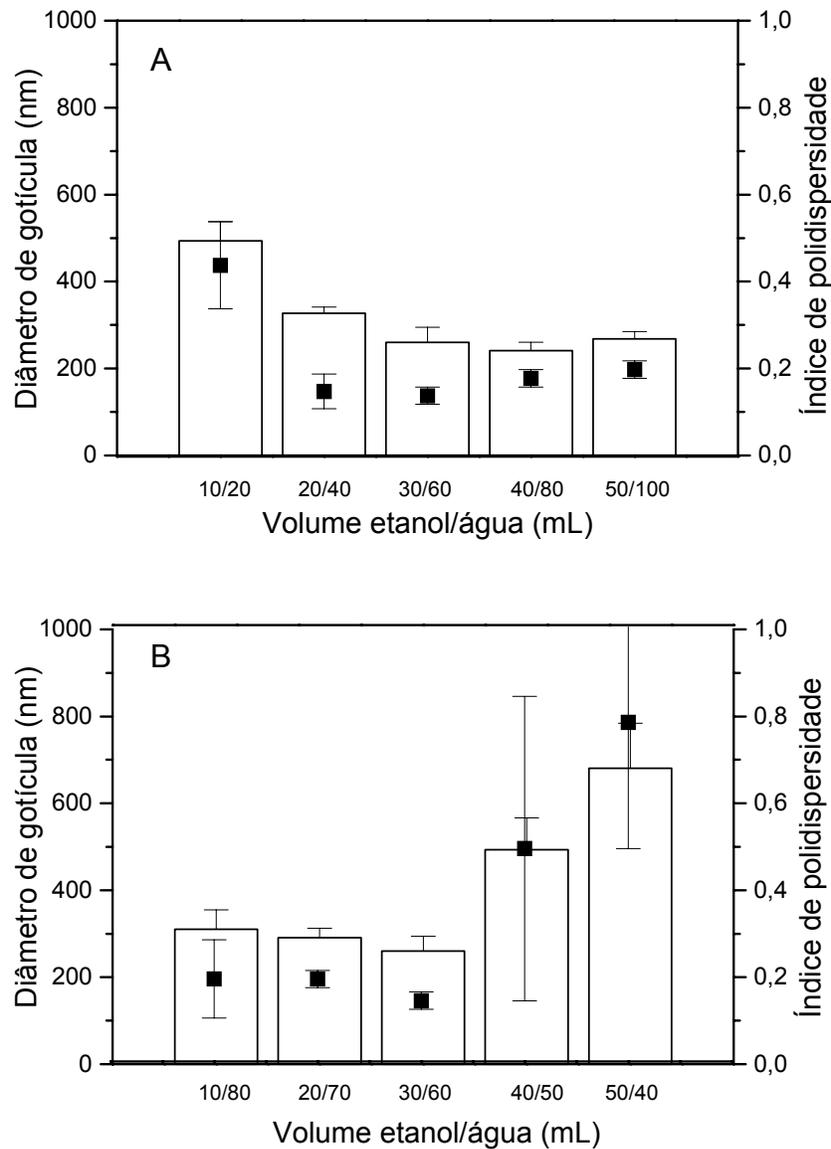


Figura 1. Diâmetro médio (barras) e índice de polidispersidade (símbolos) das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico, utilizando diferentes quantidades (A) ou relações (B) dos solventes etanol/água.

Como pode ser observado na figura 1A, o aumento progressivo da quantidade dos solventes etanol e água (10/20 a 50/100), empregado na obtenção das nanoemulsões, conduz a uma redução progressiva do diâmetro médio das gotículas, de cerca de 500 a 250 nm, até a relação 30/60, a partir da qual o diâmetro médio das gotículas permanece praticamente inalterado. O uso de quantidades adicionais de ambos os solventes (nos volumes 40/80 e 50/100) não influenciou de maneira significativa ($p < 0,05$) o diâmetro médio das gotículas. De maneira similar, o índice de polidispersidade decresce com o aumento progressivo da quantidade de etanol e água utilizada até a relação 30/60. A partir desta condição, foi detectado um índice de polidispersidade próximo a 0,2.

Partindo-se da relação 30/60, perfazendo um volume total de 90 mL, em uma segunda etapa foi avaliada a influência da relação entre os solventes etanol e água sobre o diâmetro médio e índice de polidispersidade (figura 1B). Os resultados demonstram uma pequena redução do diâmetro médio de gotícula com o aumento crescente da quantidade de etanol e redução do volume de água empregado, até a relação 30/60. Nesta condição observa-se que o índice de polidispersidade permanece próximo a 0,2. Em contrapartida, para os volumes 40/50 e 50/40, detectou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) do diâmetro médio das nanoemulsões atingindo cerca de 700 nm na maior relação 50/40 (etanol/água) utilizada. Para esta relação detectou-se, também, o maior índice de polidispersidade das formulações de cerca de 0,8. O conjunto dos resultados obtidos nesta etapa permitiu selecionar a relação 30/60 para os estudos subseqüentes.

Propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas

Utilizando-se as condições de emulsificação espontânea, estabelecidas na etapa anterior, foram preparadas nanoemulsões catiônicas contendo quantidades crescentes do lipídeo catiônico estearilamina de 0,02 até 20 mM, bem como da formulação controle isenta do lipídeo catiônico. Os resultados relativos à determinação do pH estão apresentados na figura 2.

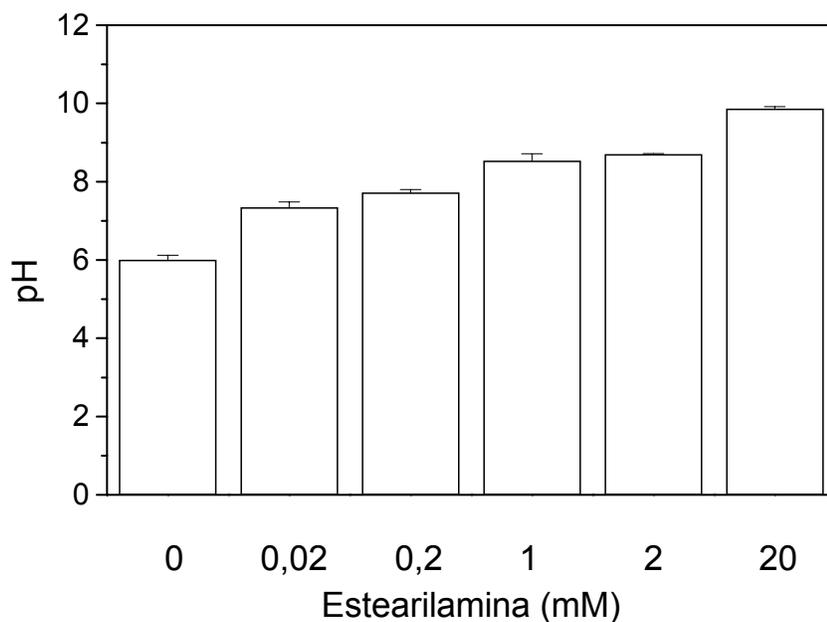


Figura 2. pH das nanoemulsões contendo concentrações crescentes do lipídeo catiônico estearilamina.

Conforme pode ser observado na figura 2, o pH da formulação isenta do lipídeo catiônico estearilamina é de cerca de 6,0. A adição crescente de estearilamina conduz a um aumento significativo ($p < 0,05$) e progressivo do pH final das nanoemulsões catiônicas. Este aumento está compreendido entre cerca de 8,0 (para a menor concentração de estearilamina: 0,02 mM) e 10,0 (para a maior concentração de estearilamina: 20,0 mM).

Independente da concentração de estearilamina utilizada (0,02 até 20 mM), o pH de todas as nanoemulsões catiônicas foi ajustado até cerca de 7,0, com solução de ácido clorídrico, previamente à caracterização das propriedades físico-químicas das nanoestruturas. A figura 3 apresenta os resultados obtidos na avaliação do diâmetro médio de gotículas (3A), da viscosidade (3B), do potencial zeta (3C) e da tensão superficial (3D) das nanoemulsões contendo quantidades crescentes do lipídeo catiônico estearilamina, bem como da formulação controle isenta de lipídeo catiônico (PC).

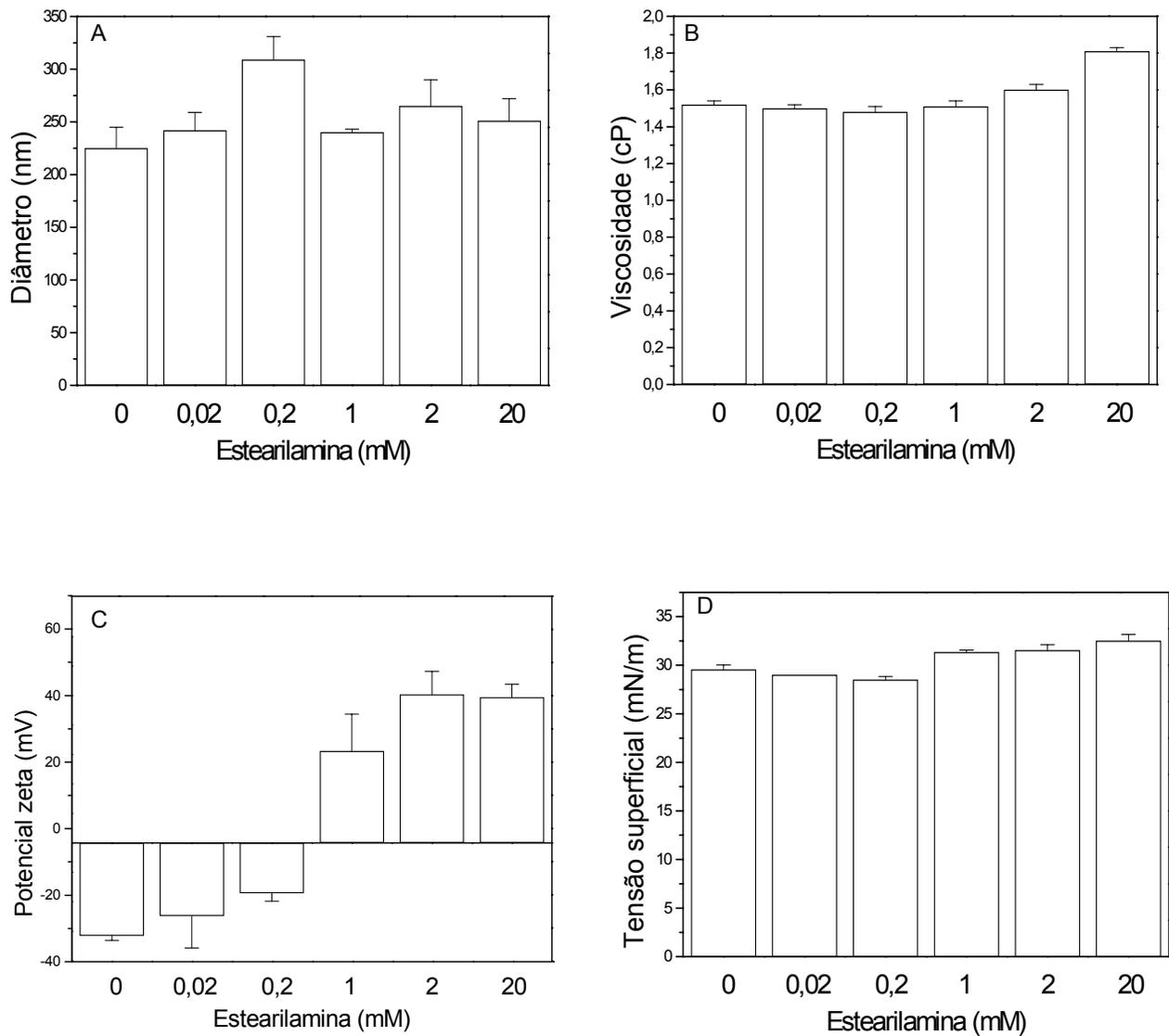


Figura 3. Diâmetro médio de gotícula (A), viscosidade (B), potencial zeta (C) e tensão superficial (D) das nanoemulsões em função da concentração de estearilamina utilizada.

Conforme a figura 3A, excetuando-se a concentração 0,2 mM de estearilamina, todas as outras apresentaram diâmetro médio e índice de polidispersidade inferiores a 300 nm e 0,2, respectivamente. Independente da quantidade de estearilamina adicionada, a viscosidade das formulações foi inferior a 2,0 cP (3B). Da mesma forma,

a tensão superficial (3D) observada foi similar para todas as formulações, compreendida entre 29 e 32 mN/m. Em relação aos resultados do potencial zeta (3C), observa-se um valor negativo, de cerca de -30 mV, para a formulação isenta de lipídeo catiônico. De forma similar, as formulações contendo as menores concentrações de lipídeo catiônico (0,02 e 0,2 mM) apresentaram valores negativos. Em contrapartida, a adição de 1, 2 e 20 mM de esterilamina conduziu a inversão do potencial zeta, para valores positivos, até cerca de + 50 mV para as concentrações mais elevadas de lipídeo catiônico.

Com base nos resultados obtidos, em especial nos estudos de potencial zeta, a concentração do lipídeo catiônico estearilamina 2 mM foi selecionada para os estudos subseqüentes. A tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas das formulações compostas dos fosfolipídeos isolados, DSPC, DOPC, DSPE e DOPE, bem como das formulações PC/EA e PC. Todas as formulações foram obtidas utilizando-se a relação etanol/água 30/60, conforme condições previamente estabelecidas neste estudo.

Em uma etapa prévia à avaliação das propriedades físico-químicas das nanoemulsões, o pH das formulações DSPC e DOPC foi ajustado à cerca de 7,4. Contudo, no caso específico das formulações DSPE e DOPE, foi necessário o ajuste do pH da fase aquosa previamente ao procedimento de emulsificação espontânea a fim de viabilizar a formação da nanoestrutura. Desta forma, o pH final de todas as formulações foi ajustado a cerca de 7,4. Os resultados relativos à avaliação do diâmetro médio de gotícula, potencial zeta, tensão superficial e viscosidade das nanoemulsões catiônicas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas contendo os diferentes fosfolípeos.

	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)	Tensão superficial (mN/m)	Viscosidade (cP)
PC/EA	264±19	+54±5,0	32±0,7	1,8±0,12
DSPC/EA	267±33	+67±1,7	36±0,1	3,8±0,02
DOPC/EA	271±12	+67±2,8	36±0,3	3,5±0,05
DSPE/EA	277±10	+61±7,6	39±3,5	1,7±0,03
DOPE/EA	286±21	+68±3,0	29±0,3	2,4±0,37

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

Os resultados obtidos demonstram valores compreendidos entre cerca de 260 e 280 nm independente do uso de lecitina de gema de ovo ou dos fosfolípeos isolados na composição das nanoemulsões. Entretanto, a viscosidade das formulações utilizando os fosfolípeos de porção polar PC foi fortemente influenciada chegando a 3,8 cP para a formulação DSPC/EA. Independente do tipo de fosfolípeo isolado empregado, observa-se, em todos os casos, valores de potencial zeta superiores para as formulações em relação àquela estabilizada pela mistura binária lecitina e estearilamina (PC/EA). No que se refere à tensão superficial, os valores variaram entre 29 e 39 mN/m, similares ao observado para a formulação PC/EA.

Complexação do pDNA com as nanoemulsões

A figura 4 apresenta os experimentos de retardamento de migração do pDNA em gel de agarose por eletroforese em diferentes relações de carga [+/-] lipídeo catiônico/pDNA: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0.

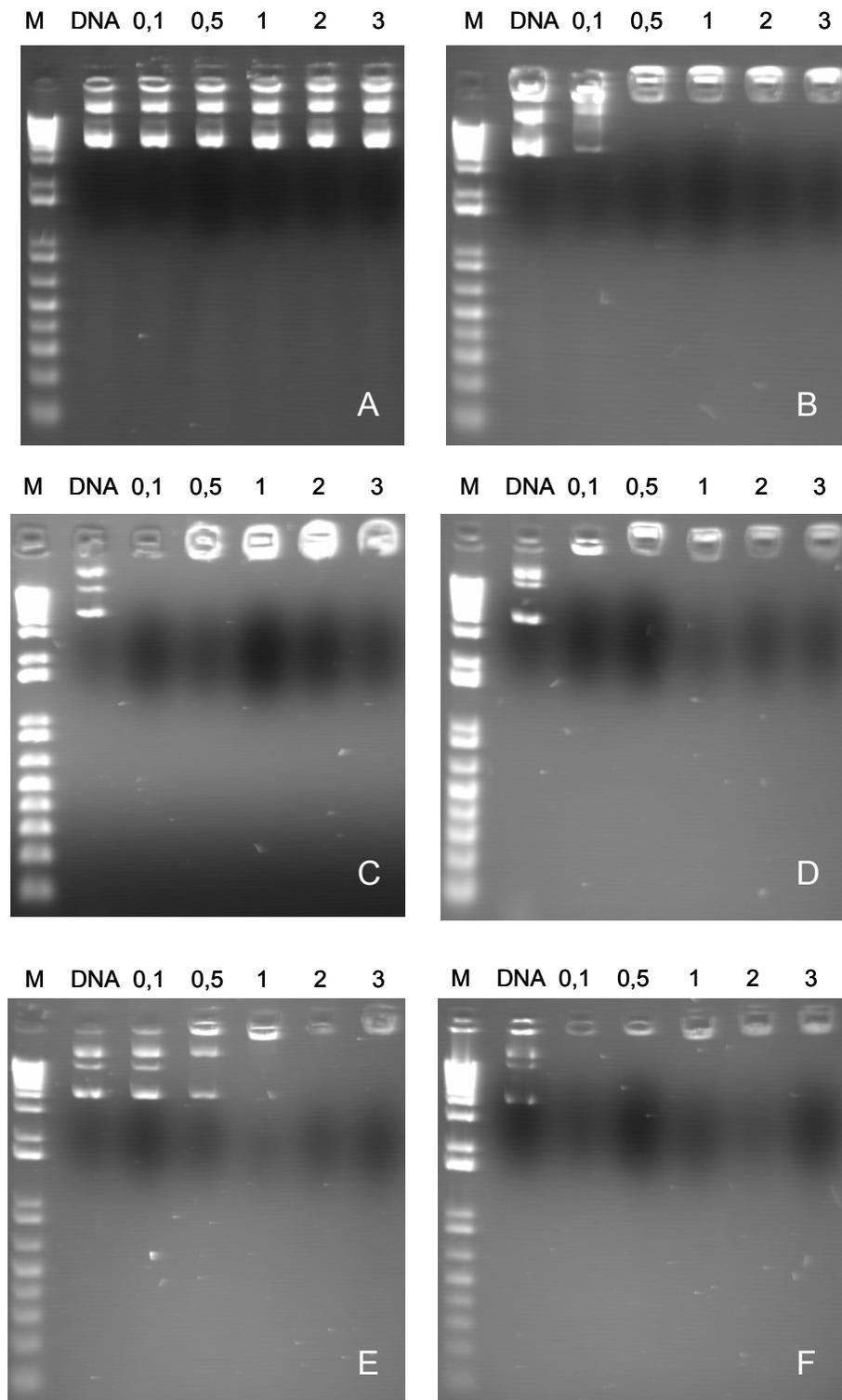


Figura 4. Migração do pDNA a partir dos complexos formados entre o pDNA e as nanoemulsões PC (A), PC/EA (B), DSPC/EA (C), DOPC/EA (D), DSPE/EA (E) e DOPE/EA (F) em gel de agarose 1% por eletroforese. Legenda: (M): marcador de peso molecular de 1Kb, (DNA): plasmídeo, (0,1; 0,5; 1; 2; 3): relação de cargas nanoemulsões/pDNA.

A figura 4A demonstra, primeiramente, a migração do pDNA a partir das nanoemulsões isentas do lipídeo catiônico estearilamina (PC), independente da quantidade de fase interna utilizada. Este resultado indica que não existe complexação do ácido nucléico com as nanoestruturas, estando o pDNA solúvel na fase externa das nanoemulsões. Em contrapartida, independente do tipo de fosfolipídeo utilizado, para todas as nanoemulsões catiônicas, contendo estearilamina, observa-se a retenção do complexo no ponto de aplicação a partir da relação de cargas $[+/-]=0,5$, indicando a formação do complexo. Contudo, para a formulação DSPE/EA, a retenção total da migração ocorre a partir da relação de cargas $[+/-]=1,0$.

Em uma segunda etapa, foram caracterizados os complexos formados entre o pDNA e as nanoemulsões catiônicas através da determinação do diâmetro médio de gotícula e potencial zeta (tabela 5), bem como através da caracterização da morfologia dos complexos formados através de microscopia eletrônica de transmissão (figura 5) com contraste negativo obtido com o uso de acetato de uranila a 2 %. Esses estudos foram realizados com complexos preparados na relação de cargas $[+/-]=2,0$.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos complexos pDNA/nanoemulsões catiônicas contendo os diferentes fosfolipídeos na relação de cargas $[+/-]=2,0$.

	Diâmetro de gotícula (nm)	Potencial zeta (mV)
PC	325±6	-47±11
PC/EA	296±2	+52±2
DSPC/EA	307±4	+52±3
DOPC/EA	301±23	+61±4,5
DSPE/EA	300±28	+55±3,5
DOPE/EA	309±2	+57±3,8

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

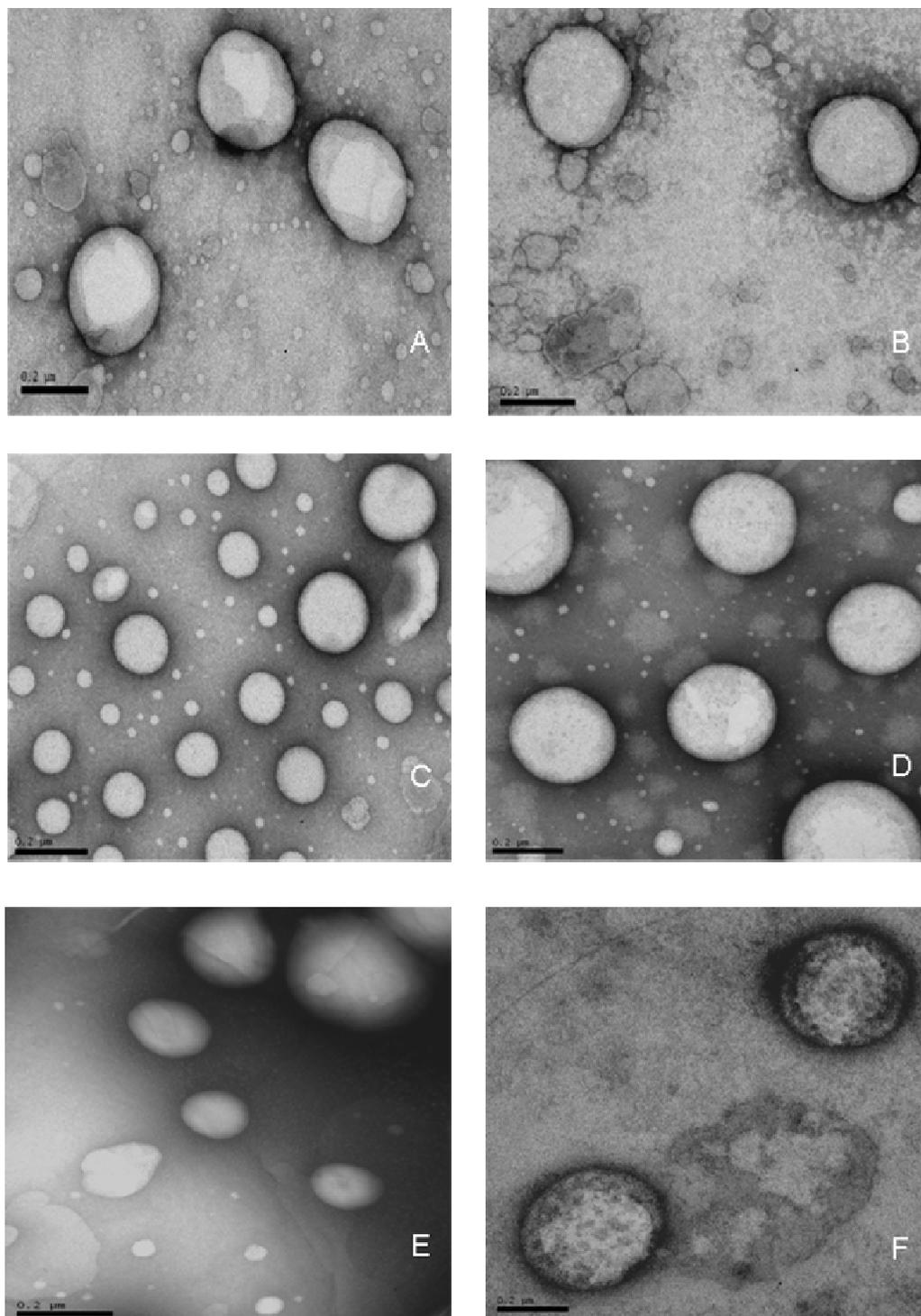


Figura 5. Fotomicrografias (MET) dos complexos formados entre o pDNA e as nanoemulsões PC (A), PC/EA (B), DSPC/EA (C), DOPC/EA (D), DSPE/EA (E) e DOPE/EA (F) na relação de cargas $[+/-]=2,0$. Aumento de 100.000x.

Como pode ser observado na tabela 5, os complexos pDNA/nanoemulsões catiônicas apresentaram diâmetro médio de gotícula compreendido entre 296 e 309 nm. A formulação isenta de lipídeo catiônico (PC) apresentou o maior diâmetro médio de 325 nm. Estes resultados são, em todos os casos, superiores aos observados para as formulações antes da complexação do pDNA, conforme pode ser observado na tabela 4. Contudo, o índice de polidispersidade, permaneceu entre 0,2 e 0,3.

Em relação à carga de superfície, detectaram-se valores de potencial zeta positivo dos complexos obtidos a partir das nanoemulsões catiônicas, de acordo com a relação de cargas $[+/-]=2,0$. O potencial zeta foi reduzido (em módulo) em até cerca de 15 mV no caso específico da formulação DSPC/SA. A formulação PC apresentou um valor de potencial zeta negativo, de cerca de -47mV, em módulo, significativamente superior ao encontrado antes da complexação.

Em relação ao estudo de microscopia, as fotomicrografias revelam gotículas de óleo dispersas de forma esférica com borda definida e corada pelo acetato de uranila (reagente de contraste). Não foi detectada uma influência marcante do tipo de fosfolipídeo utilizado, da presença do lipídeo catiônico estearilamina, ou ainda, da presença o pDNA sobre a morfologia das estruturas. As fotomicrografias revelam gotículas de 200-300 nm, da mesma ordem de grandeza, dos valores detectados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Estabilidade frente à DNase I

A figura 6 apresenta os resultados relativos ao estudo de estabilidade do pDNA complexado com as nanoemulsões obtidas a partir dos diferentes fosfolipídeos frente à enzima DNase I, bem como da nanoemulsão controle PC. Os complexos foram preparados em diferentes relações de carga $[+/-]$ lipídeo catiônico/pDNA de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0. Após, 30 minutos de incubação dos complexos com a enzima DNase I, estes foram depositados em gel de agarose e submetidos à eletroforese.

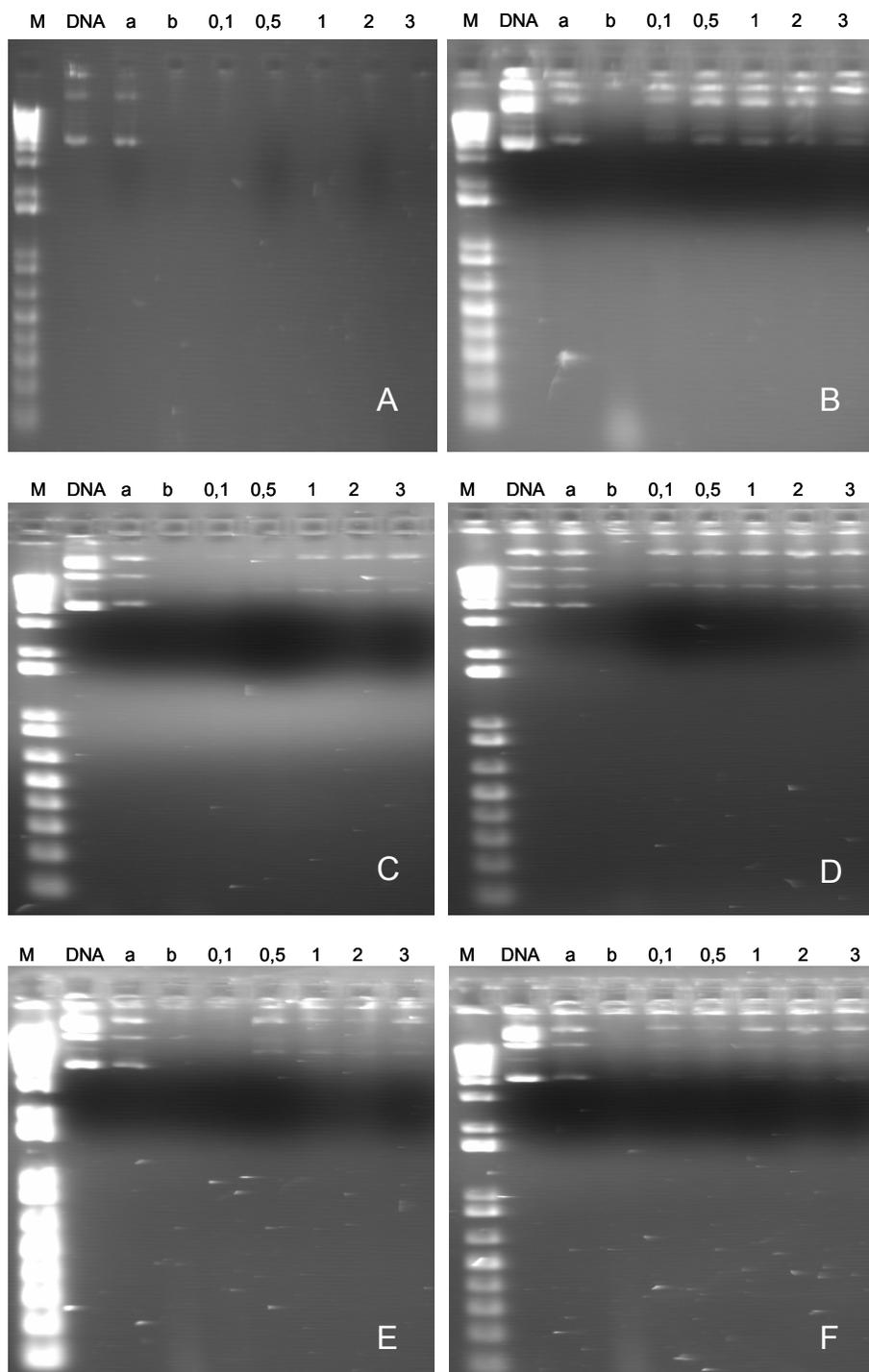


Figura 6. Migração do pDNA a partir dos complexos formados entre o pDNA e as nanoemulsões PC (A), PC/EA (B), DSPC/EA (C), DOPC/EA (D), DSPE/EA (E) e DOPE/EA (F) em gel de agarose 1% por eletroforese, após 30 minutos de incubação com a enzima DNase I. Legenda (M): marcador de peso molecular de 1Kb, (DNA): plasmídeo, (a):pDNA controle da reação de digestão, (b): pDNA+DNase I, (0,1; 0,5; 1; 2; 3): relação de cargas nanoemulsões/pDNA.

A figura 6 demonstra a presença de bandas características do pDNA intacto, após incubação com a DNase I, obtido após a extração dos complexos formados com as nanoemulsões catiônicas. Os resultados foram similares para as formulações obtidas com os diferentes fosfolipídeos. Em contrapartida, não foi detectada banda característica do pDNA complexado com a nanoemulsão isenta de lipídeo catiônico (PC), demonstrando a completa degradação do ácido nucléico nas condições experimentais estudadas.

Avaliação da citotoxicidade

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a toxicidade das nanoemulsões e seus complexos com pDNA sobre células Hep G2, utilizando o ensaio de MTT. Em uma etapa prévia, contudo, foi necessária a otimização das condições experimentais em relação ao número de células a serem cultivadas por ponto da placa (3×10^3 a 30×10^3) e a concentração de reagente MTT (0,5 e 5 mg/mL) a ser utilizada (figura 7), bem como a influência da adição do tampão Sorensen's glicina sobre o pH final (figua 8).

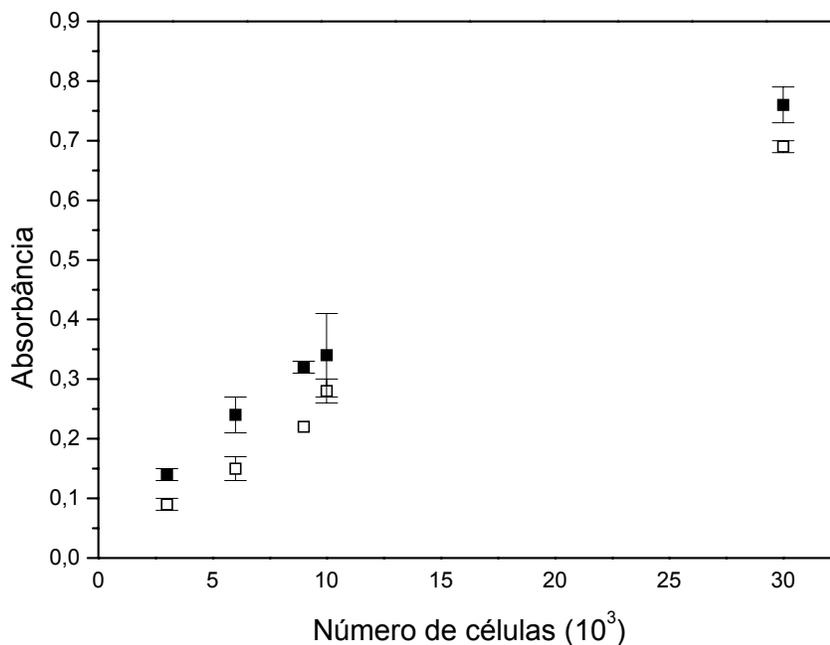


Figura 7. Relação entre absorvância e número de células Hep G2 antes da adição do tampão Sorensen's glicina. As células Hep G2 (2×10^3 a 30×10^3) foram plaqueadas, incubadas durante 24 horas, tripsinizadas e incubadas com MTT 0,5 mg/mL (\square) ou 5 mg/mL (\blacksquare).

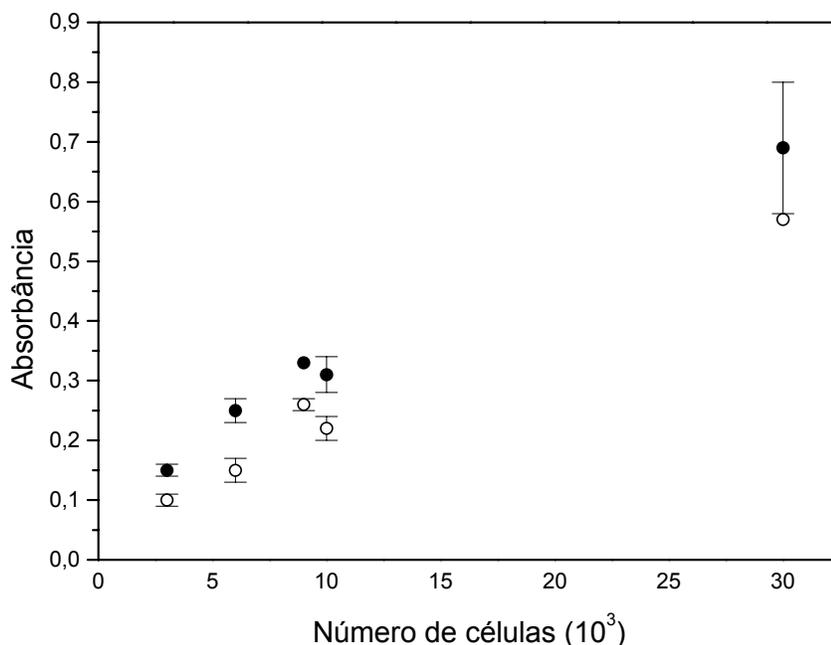


Figura 8. Relação entre absorvância e número de células Hep G2 após adição do tampão Sorensen's glicina. As células Hep G2 (2×10^3 a 30×10^3) foram plaqueadas, incubadas durante 24 horas, tripsinizadas e incubadas com MTT 0,5 mg/mL (○) ou 5 mg/mL (●).

A figura 7 demonstra que existe uma relação linear entre a quantidade de células e a absorvância medida nas condições experimentais avaliadas, com coeficiente de correlação superior a 0,99. Os resultados obtidos são similares para as duas concentrações da solução de MTT utilizadas, indicando que não existe uma influência significativa da concentração do reagente sobre a absorvância detectada. Por outro lado, independente da concentração de MTT, a adição do tampão de ajuste de pH não conduz a variações dos valores de absorvância medidos. Quanto ao número de células foi selecionada a quantidade de 1×10^4 células, uma vez que esta quantidade encontra-se na faixa de linearidade do ensaio. Por razões econômicas, a concentração de MTT utilizada nos estudos subseqüentes foi de 0,5 mg/mL com e sem ajuste de pH.

Os resultados relativos à toxicidade das nanoemulsões e seus complexos com pDNA em diferentes relações de carga [+/-], antes e após o ajuste de pH, estão apresentados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

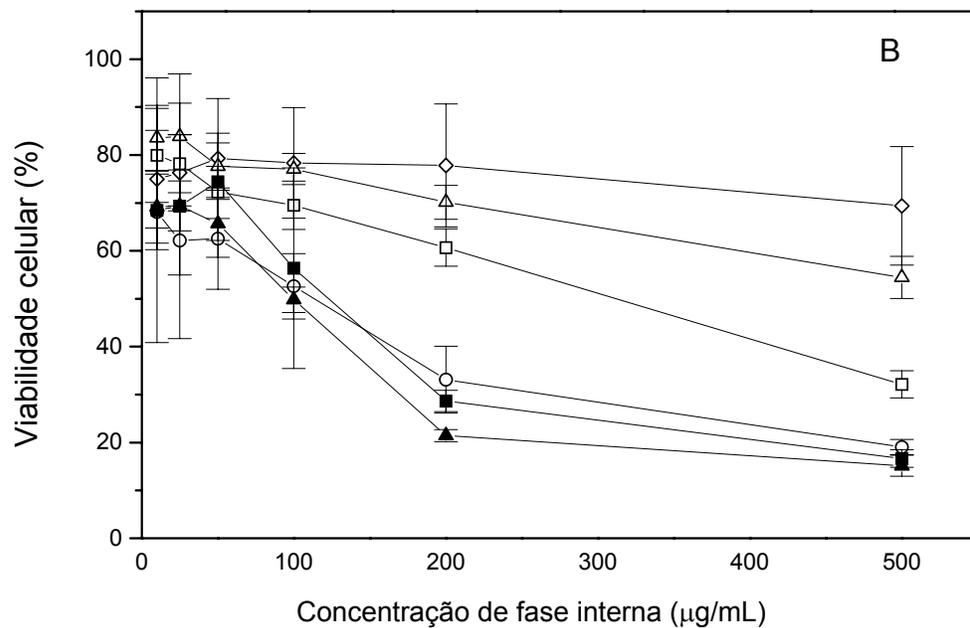
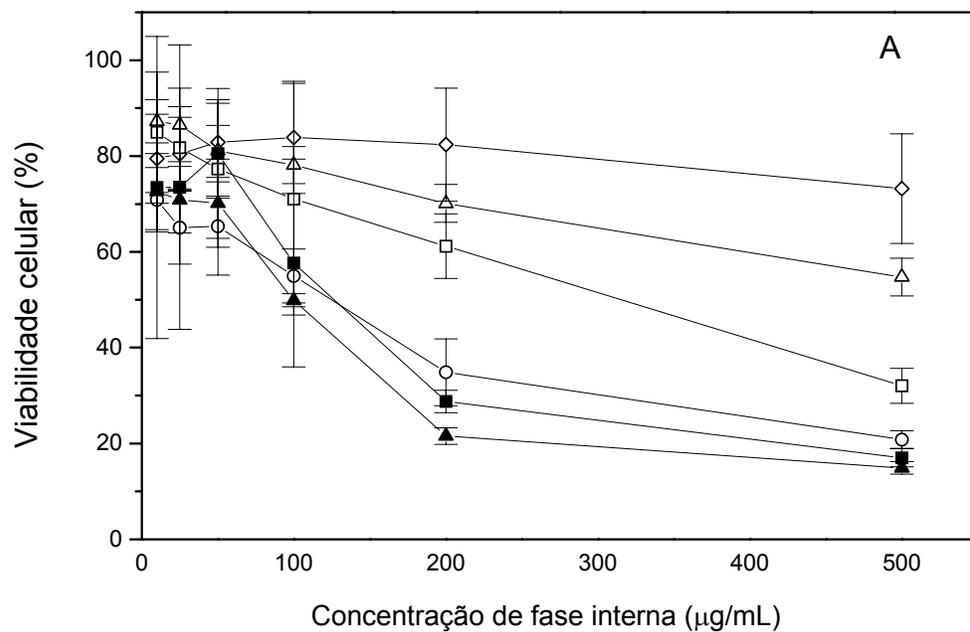


Figura 9. Viabilidade das células Hep G2 após incubação durante 24 horas com quantidades crescentes das nanoemulsões PC (◇), PC/EA (○), DSPC/EA (△), DOPC/EA (▲), DSPE/EA (□) e DOPE/EA (■) antes (A) e após (B) o ajuste com o tampão Sorensen's glicina.

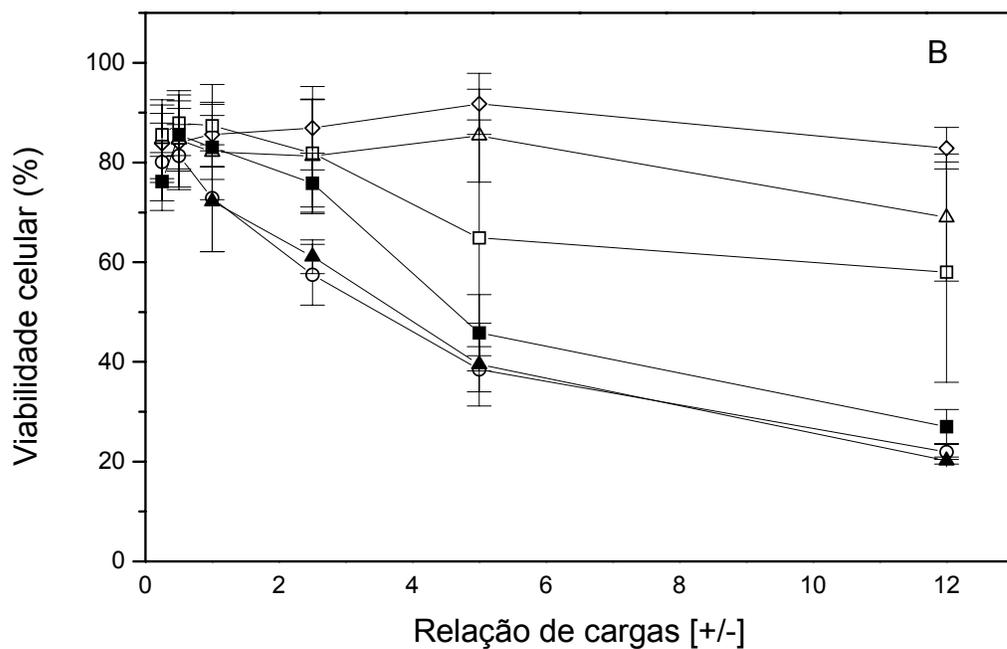
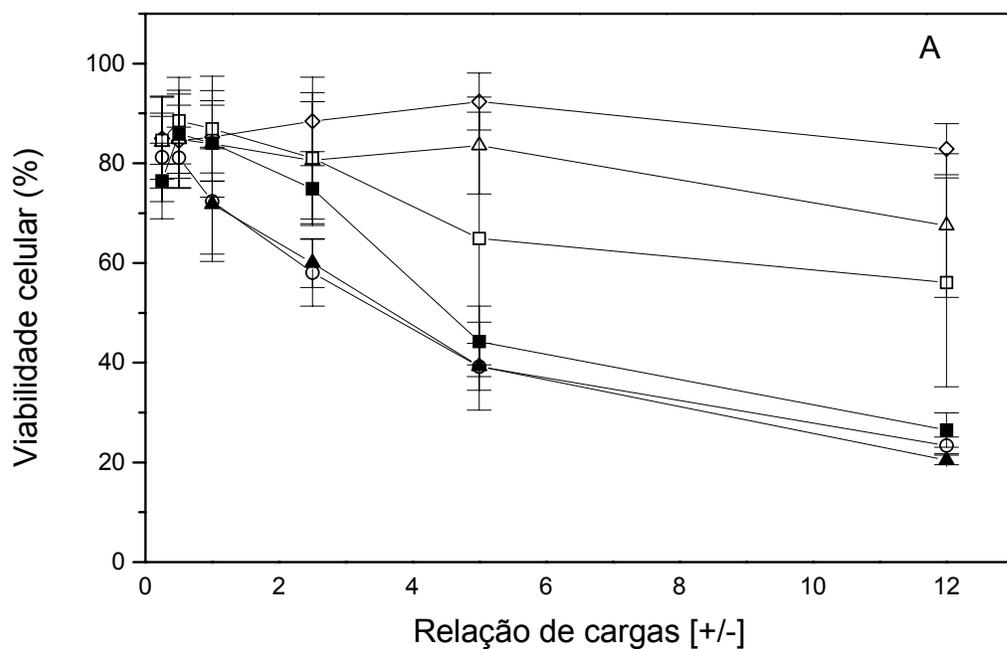


Figura 10. Viabilidade das células Hep G2 após incubação durante 24 horas com as nanoemulsões PC (◇), PC/EA (○), DSPC/EA (△), DOPC/EA (▲), DSPE/EA (□) e DOPE/EA (■) complexadas com o pDNA em diferentes relações de carga [+/-] antes (A) e após (B) o ajuste com o tampão Sorensen's glicina.

Os ensaios de citotoxicidade apresentados na figura 9 demonstraram que a adição de quantidades crescentes das nanoemulsões catiônicas, e conseqüentemente, do lipídeo catiônico estearilamina, conduz a uma toxicidade progressiva sobre as células Hep G2, independente do pH do meio. Dentre as formulações estudadas, aquelas obtidas a partir da lecitina de gema de ovo (PC/EA) e dos fosfolipídeos isolados DOPC (DOPC/EA) e DOPE (DOPE/EA) mostraram-se como as mais tóxicas, observando-se, para a concentração mais elevada de fase interna, a redução da viabilidade celular em até 80 %. Em contrapartida, a viabilidade celular, após a incubação das células Hep G2 com nanoemulsões DSPC/EA e DSPE/EA, foi de cerca de 60 e 40 % para a concentração de 500 µg/mL de fase interna, respectivamente. A formulação controle PC apresentou viabilidade de cerca de 80 % na concentração mais elevada de fase interna.

A figura 10 indica a maior toxicidade dos complexos de maior relação de cargas [+/-] nanoemulsões catiônicas/pDNA sobre as células Hep G2. Os resultados, de maneira global, demonstram a mesma tendência detectada para as nanoemulsões; uma redução mais acentuada da viabilidade celular das formulações PC/EA, DOPC/EA e DOPE/EA em relação a DSPC/EA e DSPE/EA. A formulação PC apresentou a menor toxicidade nas condições estudadas.

Avaliação da transferência gênica

Na última etapa do trabalho foi realizado um ensaio preliminar para verificar as potencialidades do uso das nanoemulsões como um sistema de transferência gênica, através da técnica de PCR em tempo real.

Neste estudo foi utilizada uma sonda TaqMan® (Applied Biosystems, USA) desenhada especificamente para o gene GFP, isto porque o emprego das sondas garante a especificidade da detecção. Em uma etapa prévia a determinação da quantidade de DNA, a sua extração foi realizada manualmente, utilizando-se um kit comercial. A tabela 6 demonstra os resultados obtidos para as formulações, bem como para o controle positivo lipofectamina.

Tabela 6. Quantidade de DNA do gene GFP detectada no ensaio de transfecção das células Hep G2 com os complexos pDNA/nanoemulsões catiônicas através da determinação por PCR em tempo real.

Formulação	Quantidade de DNA do gene GFP pg ± d.p.
PC ^a	0,94 ± 0,82
PC/EA ^b	22,6 ± 54
DSPC/EA ^b	38,0 ± 9,4
DSPE/EA ^b	17,0 ± 2,1
DOPC/EA ^b	5,5 ± 0,85
DOPE/EA ^b	4,0 ± 0,64
Lipofectamina	55 ± 60,8
Células ^c	2,4 ± 2,3

^[a] O complexo com a formulação controle PC foi realizado com quantidade equivalente de fase interna da relação de cargas [+/-]=2,0.

^[b] Todos os complexos nanoemulsões/pDNA foram obtidos na relação de cargas [+/-]=2,0.

^[c] O número de células utilizado no estudo de transfecção foi de 2×10^5 / poço.

Dentre as diferentes formulações testadas, a maior quantidade de DNA de GFP detectada (38 pg) foi a partir do uso da nanoemulsão DSPC/EA. As formulações DSPE/EA e PC/EA apresentaram valores inferiores entre 17 e 22 pg. Para as emulsões DOPC/EA, DOPE/EA, bem como para a formulação PC controle, observam-se as menores quantidades de DNA de GFP, similar ao valor das células. Em contrapartida, a maior eficiência de transfecção detectada foi para o controle positivo lipofectamina, um lipossoma comercial contendo DOSPA/DOPE, em torno de 55 pg.

DISCUSSÃO

A primeira etapa deste estudo descreve a otimização das condições de emulsificação espontânea visando à obtenção de nanoemulsões monodispersas de reduzido diâmetro de gotícula. Para tanto, foi avaliada a influência da quantidade e relação dos solventes (etanol e água) sobre o diâmetro médio das nanoemulsões. O etanol foi selecionado uma vez que é um solvente miscível com água, classificado como de baixo potencial tóxico (B.P., 1999) no qual os componentes da fase oleosa são solúveis (SHCHIPUNOV, 2002). Os resultados demonstram que o aumento crescente da quantidade de solventes conduz à redução progressiva do diâmetro das nanoestruturas. Este pode estar relacionado com o aumento da velocidade de difusão do etanol em água, em consequência da redução da concentração dos componentes da fase interna no sistema. A velocidade de difusão do solvente orgânico em água tem sido descrita como uma das principais propriedades que influencia o diâmetro de estruturas obtidas a partir de metodologias de deslocamento de solvente, como a emulsificação espontânea e nanoprecipitação (BOUCHEMAL et al., 2004; WHERLE et al., 1995). Contudo, esta redução é progressiva, até a relação 30/60, a partir da qual, não se observa uma redução suplementar do diâmetro de gotícula. Esse resultado sugere que a partir de uma determinada concentração, o soluto não exerce uma influência significativa na velocidade de difusão do solvente orgânico em água. Em contrapartida, partindo-se do volume total de solvente de 9 mL, as diferentes relações entre etanol e água não conduziram a uma redução marcante do diâmetro de gotícula. Contrariamente, o aumento da quantidade de etanol, e conseqüente redução de água, conduzem a um aumento significativo do diâmetro e polidispersão da amostra, indicando a necessidade de uma relação ótima entre a quantidade de solvente orgânico e o meio de difusão (água) no controle do diâmetro das nanoemulsões.

Nas condições otimizadas, etanol/água na relação 30/60, foram preparadas nanoemulsões catiônicas contendo quantidades crescentes de estearilamina. Esta fase teve por objetivo otimizar a quantidade de estearilamina a ser utilizada, uma vez que estes tensoativos conduzem a uma carga de superfície positiva na interface óleo/água disponível para a complexação dos ácidos nucleicos, através de interação eletrostática. Uma maior carga de superfície positiva está relacionada com um maior número de sítios de interação para o pDNA.

Em uma primeira etapa, o pH das nanoemulsões catiônicas foi determinado (figura 2). A adição crescente de estearilamina conduz a um aumento progressivo do pH final das formulações até cerca de 10, indicando o efeito do grupamento amina primária deste tensoativo catiônico sobre esta propriedade. Considerando-se o pK do lipídeo catiônico estearilamina de 10,6 (ELBAZ et al., 1996), o pH de todas as nanoemulsões catiônicas foi ajustado à cerca de 7,0, previamente à avaliação das propriedades físico-químicas, visando à obtenção de uma interface, em teoria, completamente ionizada.

Nestas condições, o potencial zeta detectado para as formulações isentas de lipídeo catiônico é negativo de cerca de -30 mV (figura 3). Esse resultado pode ser atribuído à presença de fosfolipídeos ácidos da lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]), carregados negativamente na interface das gotículas, como a fosfatidilserina, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina e fosfatidilinositol (CHANSIRI et al., 1999; LI e TIAN, 2002; YANG e BENITA, 2000), no pH final das formulações. A adição de estearilamina à nanoemulsão conduz à inversão do potencial zeta para valores positivos, demonstrando a localização deste lipídeo catiônico na interface óleo/água. Nas menores concentrações de estearilamina (0,02 e 0,2 mM) observa-se um valor de potencial zeta negativo sugerindo que o número de espécies carregadas negativamente é superior aos de moléculas de carga positiva.

A carga de superfície das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico estearilamina aumenta progressivamente até cerca de 50 mV para a concentração 2 mM, de acordo com resultados descritos previamente por Martini (2005). Contudo, quantidades suplementares de estearilamina (20 mM) não conduzem a um aumento do potencial zeta das formulações. Esses resultados sugerem a saturação da interface pelo lipídeo catiônico, conforme proposto por alguns autores (KIM et al., 2003; JEONG et al., 2001). Recentemente, entretanto, Rabinovich-Guilatt et al. (2004) demonstraram que a manutenção do potencial zeta constante de nanoemulsões catiônicas contendo concentrações crescentes do lipídeo catiônico oleilamina pode ser consequência do elevado pH de interface desses nanosistemas. Em um pH final de 7,7 os autores

descreveram para as emulsões contendo 9,3 mM de oleilamina um pH de interface de 9,6. A OA é um lipídeo catiônico que apresenta grupo funcional amina primária como a estearilamina, diferindo desta, apenas na cadeia hidrocarbonada monoinsaturada. Desta forma, os autores sugerem que neste ambiente alcalino na interface óleo/água pode ocorrer uma redução da ionização das moléculas de lipídeo catiônico e assim reduzir a sua contribuição para a carga global positiva do sistema, mantendo o potencial zeta constante.

Com base nestas observações e considerando a potencial toxicidade intrínseca dos lipídeos catiônicos (BRAZEAU et al., 1999), a menor concentração do lipídeo catiônico estearilamina (2 mM) que conduz ao maior potencial zeta foi selecionada para os estudos subseqüentes. A substituição da lecitina de gema de ovo pelos fosfolipídeos isolados (DSPC, DOPC, DSPE e DOPE) conduziu, em todos os casos, a valores superiores de potencial zeta em comparação ao detectado para a formulação PC/EA (tabela 4). Esses resultados sugerem que nas formulações utilizando fosfolipídeos isolados não existe a neutralização de uma parcela das moléculas de estearilamina pelos fosfolipídeos carregados negativamente presentes na lecitina de gema de ovo, como mencionado anteriormente.

A adição de quantidades crescentes do lipídeo catiônico conduz a valores que são, em todos os casos, compreendidos entre 250 e 350 nm, de acordo com a literatura, indicando uma influência preponderante das condições de emulsificação espontânea sobre o diâmetro das gotículas das nanoemulsões (ALVES et al., 2006; BOUCHEMAL et al., 2004; MARTINI et al., 2007). O maior diâmetro médio e índice de polidispersidade foi detectado para a formulação contendo estearilamina na concentração de 0,2 mM, de cerca de 350 nm e 0,6, respectivamente. Esse resultado pode estar relacionado com o menor valor de potencial zeta detectado podendo indicar a formação de agregados das gotículas da fase interna.

A substituição da lecitina de gema de ovo pelos fosfolipídeos isolados exerce apenas uma pequena influência no diâmetro de gotícula das nanoemulsões (tabela 4),

indicando, mais uma vez, a influência do procedimento de emulsificação sobre o diâmetro. Contudo, observa-se o efeito da natureza do fosfolípídeo empregado sobre a viscosidade das nanoemulsões. As formulações obtidas a partir do uso dos fosfolípídeos isolados DSPC e DOPC apresentaram viscosidade significativamente superior às outras formulações, sugerindo o efeito da cabeça polar fosfatidilcolina sobre esta propriedade. Esses resultados podem estar relacionados com a ionização da porção polar (colina ou etanolamina) sobre a viscosidade do sistema e necessitam de uma investigação mais aprofundada.

Independente da natureza do fosfolípídeo empregado na composição das nanoemulsões, a complexação do pDNA com as nanoestruturas foi verificada através do ensaio de retardamento de migração do pDNA em gel de agarose. As interações eletrostáticas entre os grupamentos carregados positivamente dos lipídeos catiônicos e os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos carregados negativamente têm sido consideradas como a força principal na complexação de nucleotídeos na interface óleo/água das nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001a, 2001b; TRIMAILLE et al., 2003). Neste estudo, a elevada carga de superfície compreendida entre cerca de +54 a 68 mV conduziu a adsorção completa do pDNA às nanoestruturas a partir da relação de cargas $[+/-]=1,0$. Contrariamente, a figura 4A demonstra a migração do pDNA associado com a formulação controle isenta do lipídeo catiônico estearilamina, indicando o envolvimento das interações eletrostáticas na adsorção do pDNA com as nanoemulsões.

Essas interações eletrostáticas estabelecidas entre os grupamentos fosfato do pDNA e os lipídeos catiônicos presentes na interface O/A das nanoemulsões protegeram a degradação do pDNA pela enzima DNase I (figura 6). Nas mesmas condições experimentais, o pDNA associado com a nanoemulsão controle PC foi completamente degradado não sendo detectada banda característica do mesmo. Esses resultados demonstram que o pDNA associado aos grupamentos amina primária do lipídeo catiônico estearilamina forma um complexo estável protegendo a degradação do ácido nucleico. Podem ser visualizadas as três isoformas do pDNA, circular aberto,

linear e super compactada, mesmo após a extração das nanoemulsões catiônicas e migração nos géis de agarose. Relatos da proteção da degradação de plasmídeos complexados com emulsões catiônicas, frente ao ataque de nucleases, têm sido feitos por outros autores (BARUT et al., 2005; BIVAS-BENITA et al., 2004).

A avaliação da citotoxicidade do vetor é uma condição prévia essencial ao estudo de transferência gênica. Diversas técnicas colorimétricas têm sido empregadas com esta finalidade. O ensaio de MTT tem sido amplamente utilizado uma vez que é considerada uma técnica versátil, rápida e precisa para a quantificação da toxicidade em diferentes linhagens celulares. O sinal gerado nesse ensaio é dependente do grau de ativação das células podendo este método ser utilizado para medir a citotoxicidade ou proliferação. O ensaio baseia-se na habilidade de células vivas, sob ação da enzima desidrogenase de mitocôndrias ativas, de reduzir de maneira quantitativa um corante amarelo solúvel em água, MTT, a um produto formazan roxo insolúvel em água, o MTT formazan (MOSMANN, 1983; PLUMB et al., 1989). Desta forma, no ensaio de MTT não são necessárias etapas de lavagem para a remoção do MTT do meio de cultura previamente à solubilização do produto formado (MTT formazan) uma vez que o produto e o substrato absorvem em diferentes comprimentos de onda (MOSMANN, 1983). Contudo, vários parâmetros devem ser otimizados visando à padronização das condições experimentais para cada produto estudado, como por exemplo, o número de células utilizadas, a concentração do reagente MTT, o tempo de incubação e o tempo de exposição à substância teste.

Sabe-se que o espectro de absorção do MTT formazan varia de acordo com o número de células. Diversas tentativas de utilizar o ensaio falharam em demonstrar uma relação linear entre a produção do MTT formazan e o número de células em altas densidades e valores de absorvância maiores que 0,8. Isto é particularmente importante, uma vez que, neste ensaio o maior número de células ocorre no controle. A viabilidade das células, após tratamento, é portanto determinada como um percentual de viabilidade relativo ao controle. Neste sentido, Plumb et al. (1989) sugerem o uso de até 2×10^4 células por poço visando à linearidade do método. Neste estudo, o método

mostrou-se linear para concentrações de células compreendidas entre 3×10^3 e 30×10^3 , com coeficientes de correlação superiores a 0,99 para as duas concentrações de MTT testadas (0,5 e 5 mg/mL). Por outro lado, a adição de uma concentração 10 vezes superior do reagente MTT conduziu apenas a um pequeno aumento das absorvâncias medidas, indicando, provavelmente, uma saturação do sistema. Desta forma, um número de 1×10^4 células por poço e o uso da concentração final de 0,5 mg/mL foram consideradas como as condições padronizadas de análise.

Em uma etapa subsequente, foi avaliada a influência do pH sobre as absorvâncias medidas, uma vez que o espectro de absorção do MTT formazan pode variar de acordo com o pH do meio (PLUMB et al., 1989). Em baixa quantidade de células e alto pH, o máximo de absorção é detectado no comprimento de onda de 560 a 570 nm. Entretanto, em alta quantidade de células e baixo pH, existem dois máximos de absorção, um em 510 e o outro em 570 m. De acordo com Plumb et al. (1989), a adição de um tampão com pH 10,5 ao produto de MTT formazan solubilizado pode sobrepor os efeitos de densidade celular e presença de meio de cultura na absorção. Contudo, os resultados obtidos foram similares àqueles detectados antes da adição do tampão Sorensen's glicina, sendo portanto facultado na curva de número de células o uso do tampão.

Nas condições experimentais padronizadas foi avaliada a toxicidade das diferentes nanoemulsões sobre as células Hep G2, através do ensaio de MTT. Os resultados (figura 9) demonstram a redução progressiva da viabilidade das células Hep G2 com a adição crescente das nanoemulsões catiônicas. No caso específico da formulação PC/EA, a viabilidade das células Hep G2 decresce progressivamente com a incubação de concentrações crescentes da nanoemulsão até cerca de 20 % para a maior concentração de emulsão; o IC_{50} foi de 130 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 7). Em contrapartida, a formulação controle isenta de lipídeo catiônico PC não se mostrou tóxica na faixa de concentração utilizada. Esses resultados indicam o efeito preponderante do lipídeo catiônico estearilamina sobre a toxicidade da formulação. Existem relatos da interação de lipídeos catiônicos à superfície carregada negativamente das membranas celulares

podendo causar neutralização de cargas, distorção celular, lise e aglutinação, e além disso, os lipídeos catiônicos podem se ligar ao núcleo celular e membranas internas e interferir em funções enzimáticas (BRAZEAU et al., 1998; SENIOR et al., 1991). A toxicidade intrínseca de lipídeos catiônicos monocatenários como a estearilamina, em outros sistemas lipídicos, como os lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas, foram descritos por outros autores. Senior et al. (1991) relacionam esta toxicidade celular com a labilidade destes lipídeos monocatenários nas interfaces e a possibilidade de migração desta região e interação direta com as membranas das células.

Tabela 7. IC₅₀ das diferentes nanoemulsões e complexos com pDNA antes e após adição do tampão Sorensen's glicina (SG).

Formulação	IC ₅₀ (µg/mL) ^a		IC ₅₀ [+/-] ^b	
	Sem SG	Com SG	Sem SG	Com SG
PC/EA	130	120	4,0	4,0
DSPC/EA	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
DOPC/EA	100	100	4,0	4,0
DSPE/EA	350	350	ND ^c	ND ^c
DOPE/EA	125	125	4,5	4,5

^[a] O IC₅₀ representa a quantidade de fase interna (µg/mL) que reduz a viabilidade celular em 50%.

^[b] O IC₅₀ representa a relação de cargas dos complexos (50 ng pDNA) que reduz a viabilidade em 50%.

^[c] ND: não detectada. A redução da viabilidade não alcança 50%.

Muito embora a toxicidade das nanoemulsões catiônicas esteja fortemente relacionada com a presença e quantidade do lipídeo catiônico estearilamina, o efeito dos fosfolipídeos, considerados como co-tensoativos, foi igualmente observado. A viabilidade das células Hep G2 decresce até cerca de 20 % com a adição progressiva das formulações DOPC e DOPE, de modo similar à formulação PC/EA. Em contrapartida, o uso dos fosfolipídeos DSPC e DSPE conduz a uma redução da toxicidade dos sistemas (tabela 7), em alguns casos não tendo sido possível à detecção de 50 % da viabilidade celular. A estrutura química dos fosfolipídeos empregados está apresentada na figura 11.

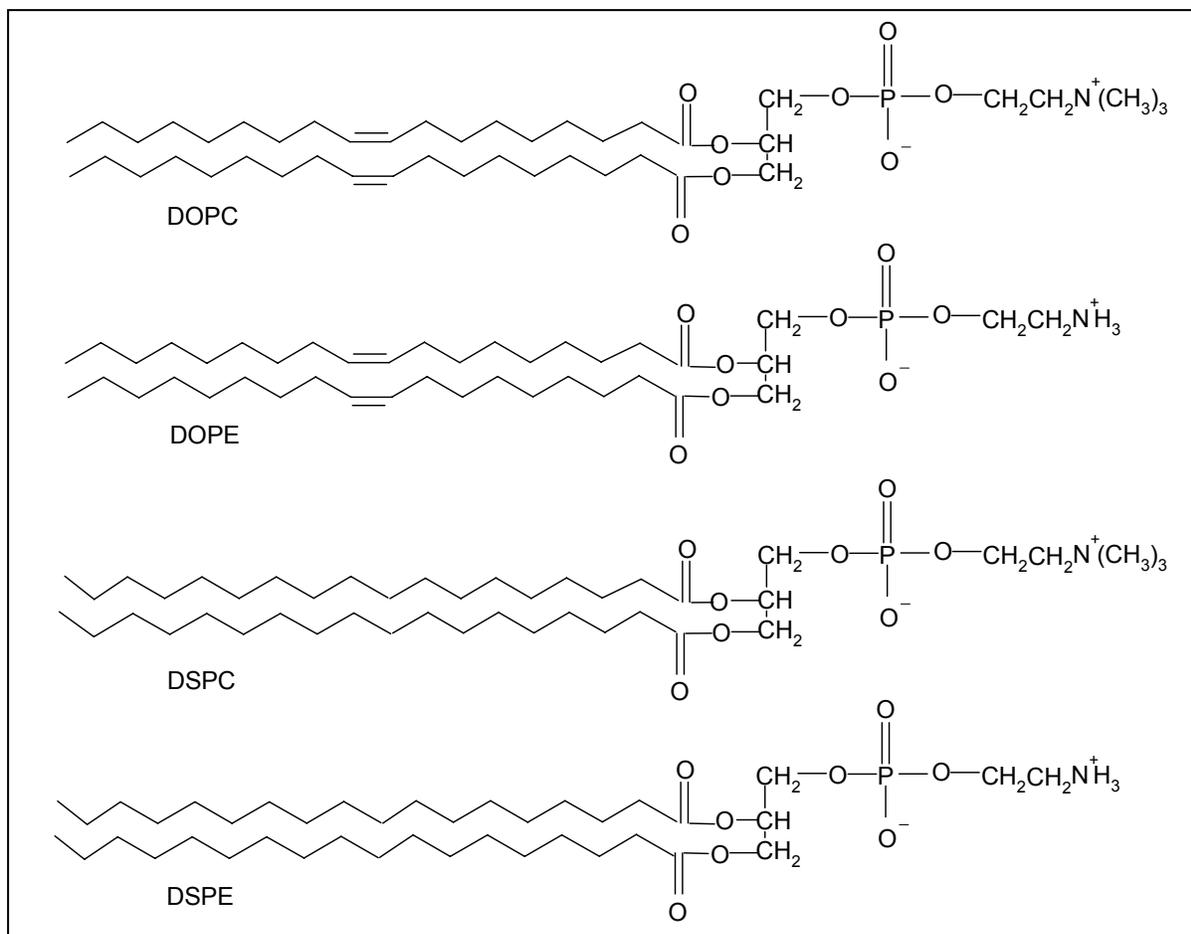


Figura 11. Estrutura química dos fosfolipídeos utilizados neste estudo.

Esses resultados podem ser relacionados com a temperatura de transição de fases desses fosfolipídeos; para a DOPC e DOPE o valor é negativo de -16 e -22°C , respectivamente, enquanto que para DSPC e DSPE, o valor é positivo de 58 e 74°C , respectivamente. A lecitina de gema de ovo não apresenta uma temperatura única uma vez que é composta de uma mistura de fosfolipídeos saturados e insaturados, contudo, a sua temperatura é considerada negativa (FATTAL et al., 1993). A temperatura de transição de fases pode ser definida como a temperatura na qual uma membrana passa da forma gel para a fase líquido-cristalina na qual os fosfolipídeos têm maior fluidez. Assim, os menores valores de IC_{50} ($100\text{-}130\ \mu\text{g/mL}$) foram detectados para as formulações estabilizadas por fosfolipídeos “fluidos” na temperatura de realização dos experimentos. Em contrapartida, a presença do fosfolipídeo DSPE (nanoemulsão

DSPE/EA) conduziu a um IC₅₀ cerca de três vezes superior ao seu análogo fluido, DOPE. De modo similar, mesmo na concentração mais elevada de fase interna (500 µg/mL), a formulação DSPC/EA não reduz a viabilidade celular em 50 %, contrariamente à formulação DOPC/EA, para a qual foi observado um IC₅₀ de 100 µg/mL. O conjunto desses resultados pode estar relacionado com a maior estabilidade do lipídeo catiônico estearilamina na interface das nanoemulsões contendo os fosfolipídeos “rígidos” na interface óleo/água, podendo reduzir a sua migração e interação com a membrana das células, conforme proposto por Senior et al. (1991). Contudo, não pode ser descartada a hipótese de uma maior interação dos fosfolipídeos “fluidos” (DOPC e DOPE) com as membranas das células conduzindo a uma maior toxicidade. O efeito da DOPE na fusão e desestabilização de membranas celulares, através da formação de uma fase hexagonal invertida, tem sido correntemente descrita na literatura (FELGNER et al., 1994; LIU et al., 1996; ZHANG et al., 2004).

Geralmente, os estudos de transferência gênica são realizados com complexos apresentando relação de cargas compreendidas entre 1,0 e 4,0 (SHEIKH et al., 2003). Desta forma, neste estudo, complexos na relação de cargas [+/-]=2,0 foram preparados e caracterizados, uma vez que nesta condição todo o pDNA está associado com a nanoestrutura (figura 4). As fotomicrografias demonstram gotículas de diâmetro compreendido entre 200-300 nm corroborando os resultados de espalhamento de luz dinâmico. Não foram detectados agregados das gotículas de fase interna através do estudo de MET. Podem ser observadas gotículas esféricas com borda definida mais escura devido à presença do reagente de contraste (acetato de uranila), sendo essa atribuída à elevada afinidade do acetato de uranila pelos ácidos nucléicos (TARHOVSKY et al., 1996). Segundo Chevaillier et al. (2004), as cargas positivas presentes no acetato de uranila se ligam irreversivelmente aos ácidos nucléicos, permitindo assim sua visualização por MET.

Em etapa prévia ao estudo de transfecção, a toxicidade dos complexos formados sobre as células Hep G2 foi avaliada. Brazeau et al. (1998) observaram a redução na citotoxicidade de complexos devido à neutralização parcial de cargas pelo pDNA.

Todavia, os resultados obtidos neste estudo, indicam uma toxicidade similar dos complexos em relação às nanoemulsões de origem, seguindo, em linhas gerais, a influência detectada para os diferentes fosfolipídeos. Esses achados devem estar relacionados com a carga de superfície dos complexos. De fato, independente da presença do pDNA, o potencial zeta dos complexos obtidos, na relação de cargas $[+/-]=2,0$, apresenta valor positivo, de até + 62 mV, refletindo o excesso de cargas positivas em relação aos grupamentos fosfato do pDNA. A manutenção da carga de superfície positiva é importante para a interação das nanoestruturas com a membrana das células de carga negativa. A adição do tampão Sorensen's glicina foi, em uma última etapa, adicionado visando ajustar o pH do meio uma vez que a estearilamina pode influenciar o pH final do meio. Contudo, não foram detectadas alterações significativas do IC₅₀ dos complexos (tabela 7).

Na última etapa do trabalho foi realizado um ensaio preliminar para verificar a potencialidade das nanoemulsões como sistemas de transferência gênica. O uso de genes repórteres vem sendo correntemente utilizado, tanto para monitorar expressão gênica quanto para determinar a localização de proteínas *in vivo*, *in situ* e em tempo real (KAIN et al., 1995). Neste estudo o gene da proteína GFP foi utilizado e a eficiência de transfecção avaliada através da técnica de PCR em tempo real. Para tanto, foi utilizada como sonda de hibridização do tipo sonda de hidrólise também denominada de sonda TaqMan[®] (Applied Biosystems). Essas sondas são oligonucleotídeos marcados com um fluorocromo doador na extremidade 5' que emitem fluorescência ao ser excitado e um receptor na extremidade 3' que absorve a fluorescência liberada pelo doador. Para que isto ocorra, o doador e acceptor devem estar espacialmente próximos. Durante a amplificação do DNA a sonda hibridiza com a cadeia complementar. A *Taq* polimerase que possui atividade 5' exonuclease, hidrolisa então a extremidade 5' da sonda, levando à liberação do fluorocromo doador. Como doador e acceptor estão nesta condição espacialmente afastados, a fluorescência emitida pelo primeiro é captada pelo leitor (COSTA, 2004; ESPY et al., 2006; JEYASEELAN et al., 2001; KUBISTA et al., 2006).

Os resultados obtidos demonstraram a influência da composição fosfolipídica sobre a transfecção das células Hep G2 (tabela 6). Dentre as formulações testadas, as maiores quantidades de DNA de GFP detectadas foram observadas com o uso dos complexos formados com as nanoemulsões DSPC/EA, DSPE/EA e PC/EA, e do controle positivo, lipofectamina. Contudo, de maneira geral, observa-se uma elevada variabilidade nos resultados obtidos, em especial, no caso da formulação PC/EA e da lipofectamina. Isso pode estar relacionado com o tipo de sonda utilizada. Neste estudo utilizou-se uma sonda TaqMan[®] (Applied Biosystems, USA) desenhada especificamente para o gene GFP, pois garante a especificidade da detecção. Entretanto, o uso de sondas extremamente específicas e sensíveis, como as utilizadas neste estudo, apresenta a desvantagem de necessitar uma padronização mais extensa, para garantir a homogeneidade dos resultados, conforme discutido por Costa (2004). Logo, os dados apresentados são preliminares, pois não houve condições de otimizar adequadamente todas as condições de detecção. Por este motivo, não foi feita análise estatística dos dados apresentados, já que, por questões de tempo e custo, foi realizado um número reduzido de repetições independentes para cada formulação. Entretanto, os dados foram apresentados para demonstrar a viabilidade de uso desse método de detecção de transferência gênica utilizando nanoemulsões catiônicas.

A maior eficiência de transfecção das nanoemulsões catiônicas obtidas a partir do uso de fosfolipídeos de elevada temperatura de transição de fases (DSPC e DSPE), em relação aos seus pares fluidos (DOPC e DOPE), pode estar relacionada com a estabilidade dos complexos formados. De fato, é conhecido que fosfolipídeos constituídos de cadeias rígidas são capazes de originar interfaces mais estáveis em relação aos seus análogos compostos de cadeias fluídas como a oleil (DELATTRE et al., 1993). Entretanto, contrariamente ao esperado, a bem estabelecida e documentada influência do fosfolipídeo DOPE sobre a eficiência de transfecção não foi observada neste estudo. Alguns autores descrevem o aumento de transfecção de diferentes linhagens celulares com lipossomas (FELGNER et al., 1994) ou emulsões (HUNG et al., 2005) contendo DOPE devido a sua propriedade de formar uma fase hexagonal invertida. Esses achados podem estar relacionados com a menor estabilidade das

nanoemulsões desenvolvidas neste estudo contendo esse fosfolípídeo. Kim et al. (2001 e 2002) relataram a necessidade de incorporação de tensoativos não iônicos da série dos polissorbatos visando contornar a reduzida estabilidade das nanoemulsões estabilizadas pelo fosfolípídeo DOPE para estudos *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSÕES

- As condições de emulsificação espontânea otimizadas, utilizando etanol e água, na relação 30/60, mostraram-se adequadas para a obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro de gotícula de cerca de 250 nm.
- As propriedades físico-químicas das nanoemulsões foram influenciadas pela adição do lipídeo catiônico estearilamina, sendo que a concentração de 2 mM foi selecionada para os estudos subseqüentes, uma vez que apresentou reduzido diâmetro de gotícula de cerca de 250-300 nm e valor máximo de potencial zeta de cerca de 50 mV.
- A substituição de lecitina de gema de ovo pelos fosfolipídeos isolados (DSPC, DOPC, DSPE e DOPE) influenciou, em diferentes níveis, as propriedades físico-químicas das nanoemulsões.
- Independente da composição das nanoemulsões catiônicas, a totalidade do pDNA foi complexado com as nanoemulsões a partir da relação de cargas [+/-] igual à 1,0.
- O pDNA quando complexado com as nanoemulsões catiônicas foi protegido da degradação frente à enzima DNase I.
- A toxicidade das nanoemulsões catiônicas está principalmente relacionada com a presença do lipídeo catiônico estearilamina, contudo, observou-se uma maior citotoxicidade para as formulações obtidas a partir dos fosfolipídeos “fluídos” (DOPC, DOPE e lecitina de gema de ovo) em comparação aos fosfolipídeos “rígidos” (DSPC e DSPE).
- O estudo preliminar de transferência gênica, utilizando a técnica de PCR em tempo real, demonstrou as potencialidades de uso das nanoemulsões desenvolvidas como reagentes de transfecção de pDNA em células Hep G2, sendo que a maior eficiência de transfecção detectada parece ser para a formulação DSPC/EA.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, vol. 60, p. 900-904, 2005.

ARII, K.; FUKUTA, Y.; KAI, T.; KOKUBA, Y. Preparation of fine emulsified fat particles without glycerol for intravenous nutrition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.9, p.67-73, 1999.

BARUT, K. D.; COSKUN ARI, F. F.; ÖNER, F. Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system. **Turkish Journal of Chemistry**, vol.29, p.27-40, 2005.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.82, no.11, p.1069-1079, 1993.

BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMEIJN, S.; VAN MEIJGAARDEN, C.; KOERTEN, H.; VAN DER MEULEN, H.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; JUNGINGER, H.; BORCHARD, G. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **Journal of Controlled Release**, vol. 100, p. 145-55, 2004.

BOLDYREV, V. V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol.2, no.2, p.143-145, 1995.

BOTTEGA, R.; EPAND, R. M. Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. **Biochemistry**, vol. 31, p. 9025-9030, 1992.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.280, p.241-251, 2004.

BRAZEAU, G.; ATTIA, S.; POXON, S.; HUGUES, J. In vitro myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non-viral gene delivery. **Pharmaceutical Research**, vol.15, p.680-684, 1998.

BRITISH Pharmacopoeia. 3. ed. London: The Stationery Office, 1999. CD Version.

BROWN, M. D.; SCHÄTZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 229, p. 1-21, 2001.

BURLAMAQUE-NETO, A. C. **Terapia Gênica: Contribuição para uma abordagem farmacológica**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CAMPBELL, R. B.; BALASUBRAMANIAN, S. V.; STRAUBINGER, R. M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1512, p.27-39, 2001.

CAVAZZANA-CALVO, M.; HACEIN-BEY, S.; de SAINT BASILE, G.; GROSS, F.; YVON, E.; NUSBAUM, P.; SELZ, F.; HUE, C.; CERTAIN, S.; CASANOVA, J-L.; BOUSSO, P.; LEDEIST, F.; FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. **Science**, vol. 288, no. 5466, p. 669-672, 2000.

CHANG, F. H.; LEE, C. H.; CHEN, M. T.; KUO, C. C.; CHIANG, Y. L.; HANG, C. Y.; ROFFLER, S. Surfection: a new platform for transfected cell arrays. **Nucleic Acids Research**, vol. 32, p. e33, 2004.

CHANSIRI, G.; LYONS, R. T.; PATEL, M. V.; HEM, S. L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.88, no.4, p.454-458, 1999.

CHESNOY, S.; DURAND, D.; DOUCET, J.; SLOTZ, D. B.; HUANG, L. Improved DNA/Emulsion complex stabilized by poly(ethylene glycol) conjugated phospholipid. **Pharmaceutical Research**, vol. 18, no. 10, p. 1480-484, 2001.

CHEVAILLIER, P. Étude au microscope électronique de l'interaction de l'acide désoxyribonucléique et des polyamines. **Experimental Cell Research**, vol.58, p.213-224, 2004.

CHOI, B. Y.; CHUNG, J. W.; PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, Y. I.; KOH, Y. H.; KWON, J. W.; LEE, K. H.; CHOI, H. J.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Gene Delivery to the rat liver using cationic lipid emulsion/DNA complex: comparison between intra-arterial, intraportal and intravenous administration. **Korean Journal of Radiology**, vol. 3, p. 194-98, 2002.

CHOI, W. -J.; KIM, J. -K.; CHOI, S. -H.; PARK, J. -S.; AHN, W. -S.; KIM, C. -K. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. **Biomaterials**, vol. 25, p. 5893-903, 2004.

CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, vol.71, p.339-350, 2001.

COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, vol. 22, no. 5, p. 299-305, 2004.

DASS, C. R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. **Journal of Molecular Medicine**, vol. 82, no. 9, p. 579-91, 2004.

DELATTRE, J.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F.; PHILIPPOT, J.-R. ; SCHUBER, F. **Les liposomes – Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques**. Paris : Les éditions ISERM, 1993.

ELBAZ, E.; ZEEVI, A.; KLANG, S.; BENITA, S. Positively charged submicron emulsions - a new type of colloidal drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.96, p.R1-R6, 1996.

ELOUAHABI, A.; RUYSSCHAERT, J-M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. **Molecular Therapy**, vol. 11, no. 3, p. 336-347, 2005.

ESCRIOU, V.; CIOLINA, C.; HELBLING-LECLER, A.; WILS, P.; SCHERMAN, D. Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. **Cell Biology and Toxicology**, vol. 14, p. 95-104, 1998.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAD, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COKERILL III, F. R.; SMITH, T. F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 19, no. 1, p. 165-256, 2006.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt.1. cap. V.2.7.

FATTAL, E. Méthodes de préparation des liposomes. In: DELATTRE, J. **Les liposomes – Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques**. Paris : Les éditions ISERM, 1993.

FELGNER, P. L.; GADEK, T. R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 84, p. 7413-417, 1987.

FELGNER, J. H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C. N.; WHEELER, C. J.; TSAI, Y. J.; BORDER, R.; RAMSEY, .P; MARTIN, M.; FELGNER, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, no. 4, p. 2550-61, 1994.

FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, vol. 2, no. 4, p.134-43, 1999.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 1-9, 2004.

GENE THERAPY CLINICAL TRIALS WORLDWIDE. Disponível em: <www.wiley.co.uk/genmed/clinical> Acesso em: 25 ago. 2005.

GLOVER, D. J.; LIPPS, H. J.; JANS, D. A. Towards safe non-viral therapeutic gene expression in humans. **Nature Reviews**, vol. 6, p. 299-310, 2005.

HARA, T.; LIU, F.; LIU, D.; HUANG, L. Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 24, p. 265-71, 1997.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical Methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.87, no.2, p.125-129, 1998.

HEYES, J. A.; NICULESCU-DUVAZ, D.; COOPER, R. G.; SPRINGER, C. J. Synthesis of novel cationic lipids: effect of structural modification on the efficiency of gene transfer. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 45, p. 99-114, 2002.

HONG, J. W.; PARK, J. H.; HUH, K. M.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Pegylated polyethylenimine for in vivo local gene delivery based on lipiodolized emulsion system. **Journal of Controlled Release**, vol. 99, p. 167-176, 2004.

HUNG, C. -H.; HWANG, T. -L.; CHANG, C. -C.; FANG, J. -Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 289, p. 197-208, 2005.

ISHII, F.; SASAKI, I.; OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.42, p.513-515, 1990.

JEONG, M-W.; SEONG-GEUN, O.; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta-potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 181, no. 1-3, 15, p. 247-253, 2001.

JEYASEELAN, K.; MA, D.; ARMUGAN, A. Real-time detection of gene promoter activity: quantitation of toxin gene transcription. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, no. 12 e 58, p. 1-5, 2001.

JUMAA, M.; MÜLLER B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.163, p.81-89, 1998.

JUMAA, M.; MÜLLER B. W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.183, p.175-184, 1999.

KAIN, S. R.; ADAMS, M.; KONDEPUDI, A.; YANG, T. T.; WARD, W. W.; KITTS, P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. **Biotechniques**, vol. 19, p. 650-655, 1995.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, 2007. No prelo.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. In vivo gene transfer to the mouse nasal cavity mucosa using a stable cationic lipid emulsion. **Molecules and Cells**, vol. 10, no. 2, p. 142-47, 2000.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as *in vitro* and *in vivo* transfection agents. **Pharmaceutical Research**, vol. 18, no. 1, p. 54-60, 2001.

KIM, T. W.; KIM, Y. J.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer. **Journal of Controlled Release**, vol. 82, p. 455-65, 2002.

KIM, Y. J.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 252, p. 241-52, 2003.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; SHIN, B. C.; JEONG, S. Y. Polycations enhance emulsion-mediated in vitro and in vivo transfection. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.295, p.35-45, 2005.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; KANG, T. A.; HAN, H. D.; JEONG, S. Y. Induction of immunity against hepatitis B virus surface antigen by intranasal DNA vaccination using a cationic emulsion as a mucosal gene carrier. **Molecules and Cells**, vol. 22, no. 2, p. 175-181, 2006

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. (Ed.). **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s.l.]: Harwood academic publishers, 1998.

KOOSTRA, N. A.; VERMA, I. M. Gene therapy with viral vectors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 43, p. 413-439, 2003.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27, p. 95-125, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, Vol. II, p. 1517, 2001.

LECHARDEUR, D.; VERKMAN, A. S.; LUKACS, G. L. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 57, p. 755-67, 2005.

LEE, M.-K.; CHUN, S.-K.; CHOI, W.-J.; KIM, J.-K.; CHOI, S.-H.; KIM, A.; OUNGBHO, K.; PARK, J.-S.; AHN, W. S.; KIM, C.-K. The use of chitosan as a condensing agent to enhance emulsion-mediated gene transfer. **Biomaterials**, vol.26, p.2147-2156, 2005.

LI, L. C.; TIAN, Y. Zeta potential. In: JAMES, S.; JAMES C. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.

LI, S.; HUANG, L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. **Gene Therapy**, vol. 7, p. 31-4, 2000.

LIU, F.; YANG, J.; HUANG, L.; LIU, D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. **Pharmaceutical Research**, vol. 13, no. 11, p. 1642-646, 1996.

LUNDSTROM, K. Latest development in viral vectors for gene therapy. **Trends in Biotechnology**, vol. 21, no. 3, p. 117-122, 2003.

LV, H.; SHUBIAO, Z.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 114, p. 100-109, 2006.

MAA, Y. -F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development and Technology**, vol.4, no.2, p.233-240, 1999.

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; TEIXEIRA, H. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química nova**, 2007. No prelo.

MATTE, U. S.; GIUGLIANI, R. Terapia Gênica- Aspectos Técnicos. In: BINSFELD, P. C. (ed.). **Biossegurança em Biotecnologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

MIN, K. A.; LEE, S. K.; KIM, C. -K. Improved gene expression pattern using Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid and cationic emulsion. **Biomaterials**, vol. 26, p. 1063-070, 2005.

MIZUKOSHI, Y.; NAKAMURA, H.; BANDOW, H.; MAEDA, Y.; NAGATA, Y. Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate. **Ultrasonics sonochemistry**, vol.6, p.203-209, 1999.

MONTIER, T.; DELEPINE, .P; PICHON, C.; FEREC, C.; PORTEOUS, D. J.; MIDOUX, P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. **Trends in Biotechnology**, vol. 22, p: 586-92, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.89, no.5, p.614-626, 2000.

NAINI, V.; SINGH, S. Homogenization and homogenizers. In: JAMES, S.; JAMES C. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2.ed. USA: Marcel Dekker Inc., 2002.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; da SILVA, E. F. A. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 7, p. 109-16, 2002.

NATHWANI, A. C.; BENJAMIN, R.; NIENHUIS, A. W.; DAVIDOF, A. M. Current status and prospects for gene therapy. **Vox Sanguinis**, vol. 87, p. 73-81, 2004.

NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 57, p. 675-88, 2005.

OPALINSKA, J. B.; GEWIRTZ, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. **Nature Publishing Group**, vol. 1, p. 503-14, 2002.

OTT, G.; SINGH, M.; KAZAZ, J.; BRIONES, M.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; O'HAGAN, D. T. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. **Journal of Controlled Release**, vol.79, p.1-5, 2002.

PAN, G.; SHAWER, M.; OIE, S.; LU, D. R. In vitro gene transfection in human glioma cells using a novel and less cytotoxic artificial lipoprotein delivery system. **Pharmaceutical Research**, vol. 20, no. 5, p. 738-744, 2003.

PARK, K. -M.; LEE, M. -K.; HWANG, K. -J.; KIM, C. -K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.183, p.145-154, 1999.

PLUMB, J. A.; MILROY, R.; KAYE, S. B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Research**, vol. 49, p. 4435-4440, 1989.

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; GOLDSTEIN, D.; BENITA, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol.131, p.1-13, 2004.

ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANI, S. C. Viral vectors for gene therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 80, no. 1, p. 35-47, 1998.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.263, p.85-94, 2003.

SAAD, S. T. O. **Seminários CGU**, 2000. Disponível em: <http://www.cgu.unicamp.br/seminarios/2000/terapia_genica.html> Acesso em: 25 mar. 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Nova York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989. vol. 3.

SENIOR, J. H.; TRIMBLE, K. R.; MASKIEWICZ, R. Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1070, p. 173-179, 1991.

SHCHIPUNOV, Y. A. Lecithin. In: HUBBARD, A. T. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.

SHEIKH, M.; FEIG, J.; GEE, B.; LI, S.; SAVVA, M. In vitro lipofection with novel series of symmetric 1,3-dialkoylamidopropane-based cationic surfactants containing single primary and tertiary amine polar head groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 124, p. 49-61, 2003.

SHIMOMURA, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. **Journal of Microscopy**, vol. 217, p. 3-15, 2005.

SILVA, C.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; de OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, vol. 25, no. 1, p. 17-21, 2006.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAEISSON, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions--effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.252, p.123-132, 2003.

SOMIA, N.; VERMA, I. M. Gene therapy: trials and tribulations. **Nature Reviews Genetics**, vol. 1, no. 2, p. 91-9, 2000.

SORGI, F. L.; HUANG, L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.144, p.131-139, 1996.

TARAOVSKY, Y. S.; KHUSAINOVA, R. S.; GORELOV, A. V.; NICOLAEVA, T. I.; DEEV, A. A.; DAWSON, A. K.; IVANITSKY, G. R. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. **FEBS Letters**, vol. 390, no. 2, 1996.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, vol.16, no.1, p.30-36, 1999.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; DEVERRE, J. R.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Factors influences the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. **Journal of Controlled Release**, vol.70, p.243-255, 2001a.

TEIXEIRA, H.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; LEPAULT, J.; ERK, I.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. Characterization of oligonucleotide / lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. **Biophysical Chemistry**, vol.92, p.169-181, 2001b.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos *antisense* através de técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, vol. 18, no. 2, p. 89-93, 2002.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICH, L.; BOUTET, T.; DEVERRE, J. R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. **Journal of Controlled Release**, vol. 89, no. 3, p. 473-82, 2003.

THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 62, p. 27-34, 2003.

TIAN, Y.; LI, L. C. Light-scattering method in particle size analysis of parenteral emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol.24, no.3, p.275-280, 1998.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, vol.279, p.784-792, 2001.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 258, p. 135-45, 2003.

VERMA, I. M.; SOMIA, N. Gene therapy- promises, problems and prospects. **Nature**, vol. 389, p: 239-42, 1997.

VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 74, p. 711-38, 2005.

WAGNER, E.; KIRCHEIS, R.; WALKER, G. F. Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 58, p. 152-61, 2004.

WASHINGTON, C.; DAVIS, C. C. The production of parenteral feeding emulsions by microfluidizer. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.44, p.169-176, 1988.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.20, p.131-145, 1996.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. **Journal of Controlled Release**, vol. 116, p. 255-264, 2006.

WESTESEN, K.; WEHLER, T. Particle size determination of a submicron-sized emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol.78, p.125-132, 1993.

WEHRLE, P.; MAGENHEIM, B.; BENITA, S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, vol. 41, no. 1, p. 19-26, 1995.

WESTESEN, K.; WEHLER, T. Particle size determination of a submicron-sized emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 78, p.125-132, 1993.

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, vol. 247, no 4949, Pt 1, p. 1465-8, 1990.

YANG, S. C.; BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. **Drug Development Research**, vol.50, p.476-486, 2000.

YI, S. W.; YUNE, T. Y.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; CHOI, Y. W.; KWON, I. C.; LEE, E. B.; JEONG, S. Y. A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. **Pharmaceutical Research**, vol. 17, no. 3, p. 314-20, 2000.

YOO, H. S.; KWON, S. M.; KIM, Y. J.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; KIM, J.; JEONG, S. Y. Cationic lipid emulsion containing heavy oils for the transfection of adherent cells. **Journal of Controlled Release**, vol.98, p.179-188, 2004.

YOO, H. S.; MAZDA, O.; LEE, H. Y.; KIM, J. C.; KWON, S. M.; LEE, J. E.; KWON, I. C.; JEONG, H.; JEONG, Y. S.; JEONG, S. Y. In vivo gene therapy of type I diabetic mellitus using a cationic emulsion containing an epstein barr virus (EBV) based plasmid vector. **Journal of Controlled Release**, vol. 112, p. 139-144, 2006.

ZAHA, A. (coord.); SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I. S.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA, S. C. da, GAIESKY, V. L. V. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

ZHANG, S.; XU, Y.; WANG, B.; QIAO, W.; LIU, D.; LI, Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. **Journal of Controlled Release**, vol.100, p.165-180, 2004.

