

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Desenvolvimento de um sistema de base lipídica para transporte e entrega de material genético a células de hepatocarcinoma

Dissertação de candidatura ao Grau de Mestre em Bioquímica, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, sob orientação do Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca e sob co-orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Pedroso de Lima.

Dina Pereira Alves Farinha
Coimbra, 2011

“O estudo é a luz da vida”

(De um grande amigo Abu Bakar Pilas)

Recordo...

*Hoje julgo-me tu,
És a chama que me aquece
No inverno ao anoitecer.
És a luz da minha alma!
És o sonho do meu viver!*

*Tenho vontade de ser gota da tua nuvem!
Vontade de ser raio do teu sol!
Vontade de ser brisa do teu vento!
Em ti sou todo sonho, toda a criação do ser.
Onde poderei eu sentir
O mundo melhor do que em ti?
Tu és a sensação das sensações,
Tu és a paixão das paixões.*

*Que lugar tão verde e tão fresco
Que sombra tão digna e luminosa
Onde me sento e sinto
Toda a tua beleza e pureza!
Sinto esse raio de sol que me bate no rosto
Oíço por entre as tuas folhas
Xixixiii pling pling da tua cascata,
Cascata onde corre a minha vida.
Que saudades tenho de ti!*

*Perdi-te naquela horrenda tarde.
E mesmo sabendo que te perdi
Desejo-te como o mar deseja a chuva
Desejo-te como a noite deseja a lua
Desejo-te como o vento deseja o sol.
Desejo-te como quem deseja!
Desejo-te porque és o meu mundo
És a minha Natureza...!*

De: *Dina Fariuha*

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado decorre de uma experiência única que passou não só pelo patamar profissional como pela componente humana, e por isso agradeço em primeiro lugar a *Elohim* e a *Hateva* por me ter concedido esta experiência única.

Agradeço ao Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca pela competência com que orientou a minha tese e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis conhecimentos, com paciência, lucidez e confiança. Pela sua crítica sempre tão atempada, como construtiva, bem-haja estou-lhe muito grata.

Um sentido agradecimento à Professora Doutora Maria da Conceição Pedroso de Lima, pela disponibilidade e acolhimento, bem como pelos seus breves mas sábios ensinamentos, o meu muito obrigada.

Ao Doutor Carlos Palmeira pela generosidade e prontidão na disponibilização de uma amostra de células HepG2.

Agradeço a Dra. Elisabete pelas palavras, ao Dr. Carvalhinho pelo auxílio, paciência, perspicuidade e por aquele abraço.

Agradeço a todos os meus colegas que directa ou indirectamente me ajudaram nesta etapa, em especial à Sandra pelo benéfico apoio, companhia, partilha... e a Anabela pelo espírito de entreaajuda.

Por último, mas de modo algum menos importante, à minha família, em especial aos meus avós maternos Alfredo e Piedade, a minha mãe Madalena e a minha tia Lurdes por todo amor, afeição, meiguice, ternura... dados aos longo de todos estes anos, sem a sua força e o constante encorajamento já mais teria chegado até aqui. Agradeço ainda ao meu avó Leonel, esteja ele onde estiver pelo seu exemplo de Homem lutador.

A todos, reitero o meu apreço e a minha eterna gratidão.

Dedicatória

Dedico este meu trabalho aos meus avós maternos Alfredo e Piedade, a minha mãe Madalena e a minha tia Lurdes pelos diversos sacrifícios suportados e por todo o amor que me dão. Com a sua ajuda cresci em responsabilidade e autonomia. Obrigada.

Resumo

O hepatocarcinoma (HCC) tem origem nas principais células do fígado, os hepatócitos, sendo por isso considerado o cancro primário deste órgão. O hepatocarcinoma é o terceiro tipo de cancro que causa maior mortalidade a nível mundial. Actualmente, as opções primárias de tratamento do HCC consistem na recessão cirúrgica do tumor, no transplante de fígado e na quimioterapia, apresentando qualquer uma destas opções de tratamento múltiplas limitações. Assim sendo, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas estratégias antitumorais, direccionadas para o HCC, que apresentem uma elevada eficiência.

A terapia génica tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de estratégias antitumorais promissoras. Contudo, a sua aplicação clínica ainda se encontra bastante limitada, nomeadamente devido à reduzida eficiência de entrega de material genético às células alvo. Assim, a aplicação da terapia génica está dependente, em grande parte, do desenvolvimento de sistemas de entrega de material genético mais eficientes. O HCC é caracterizado pela sobreexpressão do receptor das asialoglicoproteínas (ASGP), que é expresso exclusivamente no fígado. A asialofetuina é um dos ligandos reconhecidos especificamente por este receptor. Deste modo, a utilização deste ligando em sistemas de transporte de material genético poderá permitir uma entrega eficiente e direccionada dos ácidos nucleicos no HCC.

O principal objectivo deste trabalho consistiu em desenvolver um novo sistema de transporte e entrega de material genético, específico para células de hepatocarcinoma, baseado em lipossomas catiónicos, compostos por EPOPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina) e Colesterol, e em asialofetuina. Os resultados obtidos, nos estudos de transfecção realizados na linha celular de hepatocarcinoma HepG2, mostraram que a associação de asialofetuina aos lipoplexos promove uma potenciação significativa da sua actividade biológica, nomeadamente para a formulação composta por EPOPC:Colesterol/ADN, na razão de carga (+/-) 2/1, contendo 10µg de asialofetuina/µg de ADN e para a formulação preparada com EPOPC:Colesterol/ADN, na razão de carga (+/-) 4/1, contendo 20µg de asialofetuina/µg de ADN. Este aumento substancial da actividade biológica dos lipoplexos, induzido pela associação de asialofetuina, foi verificado não apenas pelo aumento da expressão do transgene (quantificação da expressão da luciferase) mas também pelo aumento da percentagem

de células transfectadas (quantificação das células que expressavam a proteína verde fluorescente). Os resultados obtidos mostraram também que a actividade biológica registada com os complexos preparados com asialofetúina, em células HepG2, foi superior à verificada com formulações que apresentaram, em diversos estudos, elevada actividade biológica em vários tipos de linhas celulares. O ensaio de protecção de material genético mostrou que a presença de asialofetúina nos lipoplexos resulta num menor acesso do brometo de etídeo ao ADN dos complexos, constituindo um indício da sua maior protecção. Na presença de galactose, que compete com a asialofetúina pela ligação ao receptor ASGP, verificou-se uma diminuição significativa da actividade biológica dos lipoplexos preparados com asialofetúina, não tendo sido, no entanto, observada uma redução da capacidade de transfecção para as outras formulações de complexos. Os resultados registados nos estudos de ligação e associação celular demonstraram que a presença de asialofetúina induz um aumento da ligação e da internalização dos lipoplexos nas células HepG2, sendo esse aumento parcialmente inibido pela presença de galactose. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que estes lipoplexos, preparados com lipossomas catiónicos de EPOPC: Colesterol e asialofetúina, constituem um novo sistema de transporte e entrega de material genético que poderá ser de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais contra o HCC.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is originated in the main liver cells, the hepatocytes, being considered the primary cancer of this organ. Hepatocellular carcinoma is the third largest cause of cancer mortality worldwide. Currently, the primary HCC treatment options consist in tumor surgical resection, liver transplantation and chemotherapy. However, all these treatment options present multiple limitations. Therefore, there is an urgent need to develop new antitumor strategies, targeting HCC and presenting high efficiency.

In the last years, gene therapy has significantly contributed to the development of promising antitumor strategies. However, its clinical application is still limited, mainly due to the reduced efficiency of genetic material delivery into target cells. Therefore, the application of gene therapy is largely dependent on the development of efficient gene delivery systems. On the other hand, HCC is characterized by the overexpression of the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), which is exclusively expressed in the liver. Asialofetuin is a ligand that specifically binds to this receptor. Regarding this, the use of this ligand in gene delivery systems may allow an efficient and targeted release of nucleic acids in the HCC.

The main goal of this work consisted in the development of a new gene delivery system, specific for hepatocellular carcinoma cells, based on cationic liposomes, composed by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EPOPC) and cholesterol, and asialofetuin. The results obtained in transfection studies, performed in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2, showed that the association of asialofetuin to lipoplexes promotes a significant increase in their biological activity, this being particularly evident for the lipoplex formulations EPOPC:Cholesterol/DNA, at the 2/1 (+/-) charge ratio, containing 10 μ g of asialofetuin/ μ g DNA, and EPOPC:Cholesterol/DNA, at the 4/1 (+/-) charge ratio, containing 20 μ g of asialofetuin/ μ g DNA. This substantial enhancement in the biological activity of the lipoplexes, induced by the association of asialofetuin, was observed not only by the increase of the transgene expression (luciferase expression quantification) but also through the enhancement of the percentage of transfected cells (quantification of cells expressing the green fluorescent protein). The results also showed that, in HepG2 cells, the biological activity of these complexes prepared with asialofetuin was higher than that obtained with other

formulations known for presenting high biological activity in different cell lines. Regarding the assay on the protection of genetic material, it was observed that the association of asialofetuin to lipoplexes results in a lower access of ethidium bromide to DNA of the complexes, providing an evidence of its higher protection. In the presence of galactose, which competes with the asialofetuin for the binding to the ASGP receptor, it was observed a significant decrease in the biological activity of the lipoplexes containing asialofetuin. This reduction was not observed for the other complexes formulations. The results obtained in the binding and cell association studies showed that the presence of asialofetuin induces an increase in the binding and internalisation of the lipoplexes in HepG2 cells, this increase being partially inhibited by the presence of galactose. The results obtained in this study show that these lipoplexes, prepared with EPOPC:Cholesterol cationic liposomes and asialofetuin, constitute a new gene delivery system that may be of great importance for the development of novel antitumor strategies against HCC.

Abreviaturas

AAV	vírus adeno-associados
AAV2	vírus adeno-associado do sorotipo 2
AAV8	vírus adeno-associado do sorotipo 8
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ASF	asialofetuina
ASGP	asialoglicoproteína
ASGPs	asialoglicoproteínas
ASGP-R	receptore asialoglicoproteína
ASH	albumina do soro humano
ASOR	asialo-orosmucoide
ATP	adenosina trifosfato
DMEM-HG	meio de cultura “Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium - High Glucose” para linhas celulares
DOPE	dioleoilfosfatidiletanolamina
DOTAP	dioleoilpropanoato de trimetilamónio
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EPOPC	1-palmitoil-2-oleoil glicero-3-etilfosfocolina
EtBr	brometo de etídio
FBS	soro fetal de bovino
GFP	proteína verde fluorescente
H1	subunidade 1 do receptor asialoglicoproteína
H2	subunidade 2 do receptor asialoglicoproteína
HBS	tampão salino com HEPES

HCC	hepatocarcinoma
HeLa	linha celular humana de um carcinoma do colo uterino
HEPES	ácido N-(2-etano-sulfónico) N´-(2-hidroxietyl) piperazina
HepG2	linha celular humana de um hepatocarcinoma
IgA	imunoglobulina A
MLV	lipossomas multilamelares
NLS	sinal de localização nuclear
OPTIMEM	meio de cultura “Reduced Serum Médium powder from Invitrogen” para formação dos complexos com a lipofectamina
PBS	tampão salino com fosfato
pCMVgfg	plasmídeo contendo o gene que codifica a GFP
pCMVluc	plasmídeo contendo o gene que codifica a luciferase
PEI	poli(etilenimina)
Rodamina-PE	rodamina-fosfatidiletanolanina
SUV	lipossomas pequenos unilamelares

Palavras-chave:

- **Terapia génica;**
- **Asialofetuina;**
- **Lipossomas catiónicos ;**
- **Hepatocarcinoma.**

Índice

Introdução	3
1.1 Incidência global do HCC.....	3
1.2 Factores de risco	5
1.3 Tratamento actual de HCC.....	7
1.4 Hepatócitos – caracterização e organização.....	7
1.5 Receptor asialoglicoproteína.....	8
1.5.1 Ligandos / Propriedades da ligação ao receptor ASGP.....	10
1.5.2 Asialofetaina	12
1.6 Terapia génica.....	13
1.7 Métodos em terapia genica	13
1.7.1 Lipossomas catiónicos	16
1.8 Interação do lipoplexo com a célula.....	17
1.8.1 Mecanismos de internalização dos lipoplexos.....	18
1.8.2 Mecanismo de fuga do lipoplexo do endossoma.....	19
1.8.3 Mecanismo de entrada do ADN para o núcleo.....	20
1.9 Métodos utilizados em terapia génica no tratamento de HCC.....	21
1.10 Objectivo.....	22
Materiais e Métodos	23
2.1 Cultura da linha celular HepG2 e Hela	23
2.2 Preparação de lipossomas catiónicos	24
2.2.1 Determinação da concentração lipídica.....	25
2.3 Preparação dos lipoplexos.....	26
2.4 Preparação das células para os estudos de transfecção	27
2.5 Actividade Biológica	27
2.5.1 Avaliação da expressão da luciferase.....	27
2.5.2 Avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo	29
2.5.3 Avaliação da expressão de GFP por microscopia de fluorescência.....	30
2.6 Determinação da viabilidade celular.....	30

2.7 Análise da ligação e associação celular dos lipoplexos	31
2.9 Avaliação da protecção do ADN conferida pelos complexos.....	32
2.10 Análise estatística	33
Resultados / Discussão	34
3.1 Efeito da asialofetuina na actividade biológica dos lipoplexos em células HepG2	34
3.2 Efeito da asialofetuina na actividade biológica dos lipoplexos em células Hela.....	37
3.3 Avaliação da citotoxicidade induzida pelos lipoplexos em células HepG2 e células Hela	38
3.4 Efeito do soro na actividade biológica dos lipoplexos na linha celular HepG2.....	40
3.5 Avaliação da percentagem de células HepG2 transfectadas	41
3.6 Efeito da associação de asialofetuina aos lipoplexos na transfecção de células HepG2...	45
3.7 Protecção do ADN associado aos lipoplexos.....	46
3.8 Efeito da presença da galactose na actividade biológica dos lipoplexos contendo asialofetuina em células HepG2.....	47
3.9 Efeito da presença de galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas pelos lipoplexos.....	51
3.10 Efeito da asialofetuina na ligação e associação celular dos lipoplexos nas células HepG2	52
Conclusão	55
Bibliografia.....	57

Introdução

O hepatocarcinoma (HCC) é o cancro primário do fígado, ou seja, derivado das principais células do fígado, os hepatócitos. O HCC desenvolve-se quando há uma mutação na maquinaria celular dos hepatócitos, o que leva a que estes se multipliquem a uma taxa mais elevada do que o normal e ou resulte na incapacidade de apoptose. Trata-se de um tumor altamente maligno, que dobra o seu volume, em média, a cada 180 dias. O hepatocarcinoma é o quinto tipo de cancro mais comum em todo o mundo e o terceiro cancro que causa maior mortalidade a nível mundial.

1.1 Incidência global do HCC

A incidência deste tipo de cancro não se distribui uniformemente em todo o globo. A maioria dos casos de hepatocarcinoma, mais de 80%, ocorre na África ou na Ásia Oriental. A China é o país mais afectado pelo HCC, 50% dos casos a nível mundial provêm deste país. Apresenta uma taxa de incidência em homens de 35,2 / 100 000 e em mulheres de 13,3 / 100 000. O Senegal, a Gâmbia e a Coreia do Sul são também países onde as taxas de incidência do HCC são elevadas.

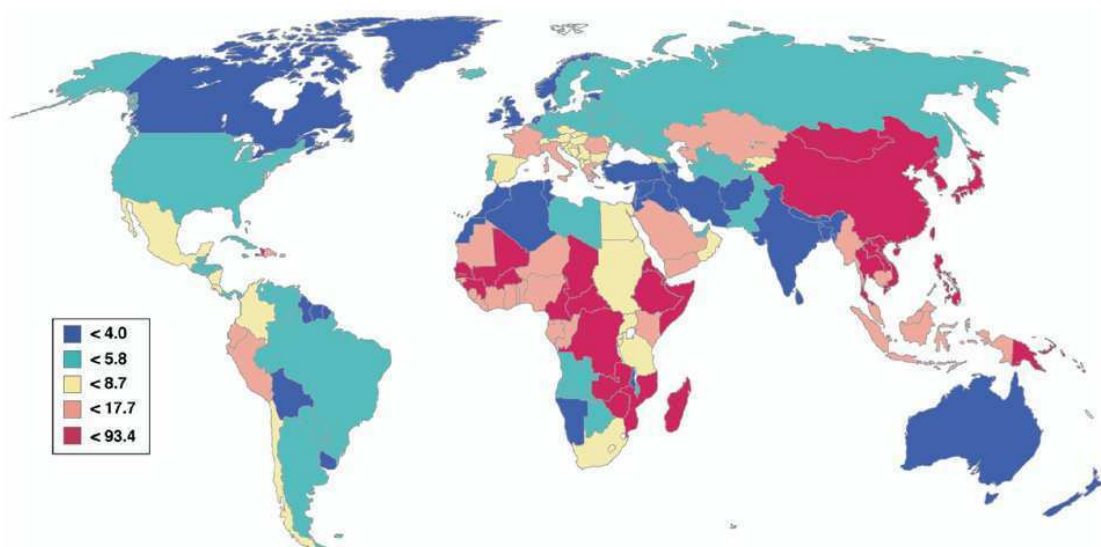


Figura 1 Variação global da taxa de mortalidade do HCC. As taxas são referidas por 100 000 pessoas. Adaptado de El-Serag HB [2]

O norte e sul da América, a Europa do Norte e a Oceânia são áreas que apresentam taxas de incidência de HCC baixas, inferiores a 5 pessoas por 100 000 habitantes. Países como a Austrália, o Canadá e a Colômbia apresentam as taxas de incidência mais baixas de HCC. Nos países do sul da Europa, como Portugal, Espanha e Itália a taxa média de incidência varia de 5 a 20 pessoas por 100 000 habitantes [1].

As taxas de incidência do hepatocarcinoma também variam muito entre as diferentes populações que vivem na mesma região. Por exemplo em Singapura entre os anos de 1993 e 1997 os homens de etnia chinesa tinha taxas de incidência de 21,21 / 100 000 enquanto os de etnia indiana apresentavam taxas de incidência de 7,86 / 100 000 [1]. Outro exemplo é o dos Estados Unidos, onde para todas as idades e em ambos os sexos, as taxas de HCC são duas vezes maiores para os asiáticos do que para os brancos latinos e não latinos, por sua vez, nestes a taxa de HCC é duas vezes maior do que em afro-americanos. A razão para esta variabilidade étnica deve-se provavelmente a diferenças na prevalência e aquisição, ao longo do tempo, de factores de risco importantes para o surgimento do hepatocarcinoma [2].

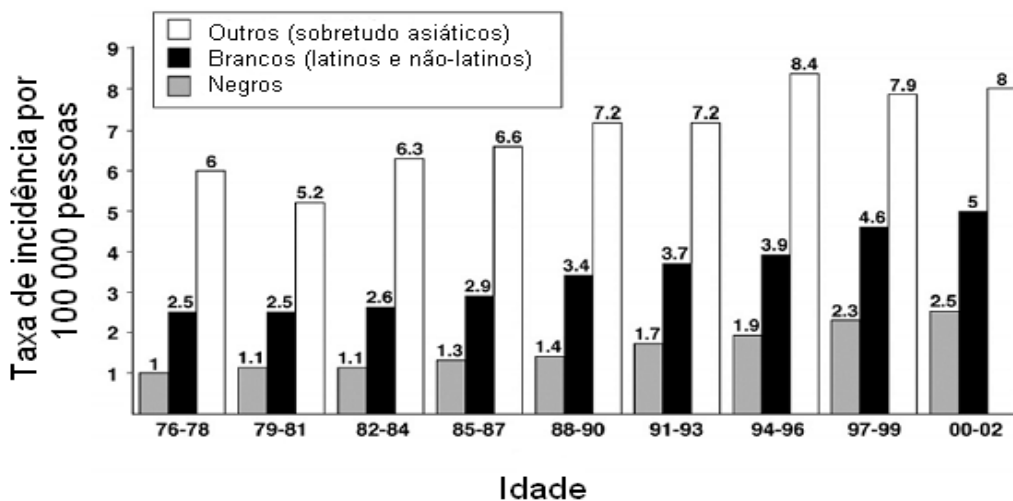


Figura 2 Gráfico demonstrativo da variação da incidência do HCC relativamente à etnia em várias faixas etárias nos Estados Unidos. Adaptado de El-Serag HB [2]

Verifica-se que em quase todas as populações, o sexo masculino é mais afectado pelo hepatocarcinoma que o sexo feminino, sendo a razão de incidência homem/mulher de HCC de 2/1 a 4/1. Actualmente, a maior discrepância nesta relação (> 4/1) é encontrada nas populações europeias. Têm sido apontadas várias razões para esta diferença de incidência do HCC, relativamente ao sexo do indivíduo. Uma das razões, é o facto de os

homens serem mais susceptíveis de estarem infectados com os vírus da hepatite B e hepatite C. Além disso, os homens consomem mais álcool, fumam mais e têm maiores reservas de ferro. No entanto, estudos apoiam a hipótese de que os factores endógenos como o índice de massa corporal e níveis mais elevados de testosterona podem também influenciar o risco de incidência de HCC [3].

A distribuição da incidência do hepatocarcinoma, varia de região para região, consoante o sexo do indivíduo e também segundo a sua etnia, para além destes factores a idade é também uma condição que causa variação da incidência do HCC. Em todas as áreas há um aumento da taxa de incidência do HCC com o aumento da idade, para além disso, na maior parte das regiões a faixa etária onde ocorre o pico de incidência do HCC para os homens corresponde aos 60-70 anos, em quanto que nas mulheres ocorre entre os 65-75 anos [2].

1.2 Factores de risco

O HCC ocorre principalmente em indivíduos que têm doenças hepáticas crónicas ou cirroses, cerca de 70 a 90% dos casos detectados de hepatocarcinoma tem origem em pacientes que tinham estes antecedentes clínicos.

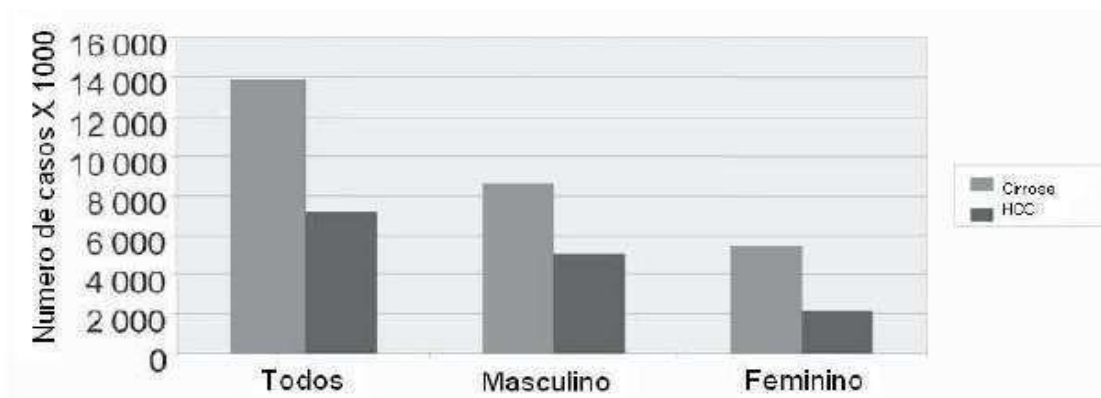


Figura 3 Gráfico que relaciona a presença de cirrose com a incidência do HCC. Adaptado de Fehér J [43]

As principais causas da cirrose em pacientes com hepatocarcinoma incluem a hepatite B e C, assim como doenças hepáticas causadas pela ingestão de álcool [2].

Globalmente o vírus da hepatite B é a causa mais frequente da ocorrência do HCC. Embora 70 a 90% dos casos de HCC se desenvolva em pacientes com cirrose, o vírus da

hepatite B é uma das causas conhecidas que leva ao desenvolvimento do HCC na ausência de cirrose. Para estes portadores crônicos do vírus da hepatite B, o risco de desenvolver hepatocarcinoma é 5 a 15 vezes superior em relação a população em geral.

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C é também um importante factor de risco para desenvolvimento de hepatocarcinoma, aumenta o seu risco de incidência cerca de 17 vezes em comparação com os indivíduos não infectados [4]. O aumento do risco de contrair HCC provocado pelo vírus da hepatite C, deve-se ao facto de este promover fibrose e eventualmente cirrose.

O consumo de álcool, definida como a ingestão de mais de 50 a 70g por dia, durante um período prolongado de tempo leva ao aumento do risco de incidência do HCC. A ingestão de grandes quantidades de álcool está fortemente associada ao desenvolvimento de cirrose. Existem poucas evidências que o álcool tem um efeito cancerígeno directo, no entanto, o consumo diário de mais de 60g de álcool por dia, aumenta de forma linear o risco de incidência do HCC [2].

A exposição a determinado tipo de substâncias como a aflatoxina leva também a um aumento da incidência do hepatocarcinoma [5].

A obesidade contribui fortemente para o aumento da actividade necro-inflamatória grave e também para um agravamento da fibrose no fígado, bem como o desenvolvimento de resistência a insulina [6]. Desta forma a obesidade pode também conduzir a um aumento do risco de desenvolver hepatocarcinoma.

Por outro lado o tabagismo bem como o uso de contraceptivos orais são factores que também tendem a aumentar o risco de incidência do hepatocarcinoma [2;7].

A dieta parece exercer um papel importante quer para aumentar, quer para diminuir o risco de incidência do hepatocarcinoma. Uma dieta rica em anti-oxidantes mostrou ter um efeito inibitório no desenvolvimento de cancros de fígado em animais [8]. Da mesma forma estudos têm relatado que beber café leva uma redução do risco do aumento das enzimas hepáticas bem como na diminuição do risco de desenvolver cirrose assim como a redução dos níveis de insulina e do risco de desenvolver diabetes tipo II. Sendo portanto um factor que diminui o desenvolvimento do hepatocarcinoma [2].

1.3 Tratamento actual de HCC

Um dos motivos para o hepatocarcinoma ser o terceiro tipo de cancro que causa maior mortalidade a nível mundial, deve-se ao facto de na maior parte dos pacientes, o hepatocarcinoma ser detectado numa fase de metástase o que resulta na limitação das opções de tratamento. Actualmente as opções primárias de tratamento do HCC consistem na recessão cirúrgica do tumor e no transplante de fígado. No entanto, a recessão cirúrgica é limitada pelo tamanho do tumor, pela presença de múltiplas lesões e da disfunção do fígado no caso de pacientes cirróticos. Alternativamente, o transplante de fígado é limitado pela escassez de enxertos compatíveis para o paciente [9;10]. Por outro lado, a quimioterapia, que também é comumente utilizada, é ineficaz na maior parte dos pacientes, devido à existência de uma panóplia de mecanismos de resistência às drogas e aos seus efeitos secundários. Desta forma, é fundamental desenvolver uma nova estratégia terapêutica, para combater o hepatocarcinoma, que seja eficiente e que apresente efeitos secundários reduzidos. A terapia genica tem vindo a contribuir para o desenvolvimento de algumas estratégias antitumorais promissoras. No entanto a sua aplicação clínica ainda se encontra bastante limitada, principalmente devido à eficiência reduzida de entrega de material genético às células alvo.

1.4 Hepatócitos – caracterização e organização

O fígado possui uma vasta gama de características que tornam este órgão bastante atraente para a terapia genica. O facto das células endoteliais sinusoidais serem fenestradas, permite a difusão livre de uma enorme variedade de substâncias entre o espaço de Disse e as sinusóides. O diâmetro das janelas é cerca de 100nm, o que apenas permite que moléculas de tamanho inferior as atravessem facilmente [11]. Os hepatócitos são células poliédricas, com um diâmetro que varia entre os 20-30µm e contêm um ou dois núcleos esféricos com um ou dois nucléolos cada. Cerca de 80% do tecido hepático é constituído por hepatócitos. Cada hepatócito possui a sua superfície em contacto com a parede do capilar sinusóide, através do espaço de Disse, e com a superfície de outro hepatócito. O encontro de duas células hepáticas delimita um espaço

conhecido como o canalículo biliar. Estes formam a primeira porção do sistema de ductos biliares, sendo apenas delimitado pela membrana plasmática de dois hepatócitos. Os hepatócitos agrupam-se em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Os lóbulos hepáticos são assim subunidades irregulares hexagonais formadas por lâminas fenestradas de hepatócitos que se dispõem de uma forma radiada em torno de uma veia central, que se localiza no centro do lóbulo [12]. Os hepatócitos são considerados, as células mais versáteis do organismo, possuem funções endócrinas e exócrinas, também acumulam, destoxificam e transportam diferentes substâncias. Além disso, produzem proteínas não só para se manterem mas também para exportação como a albumina e a protrombina.

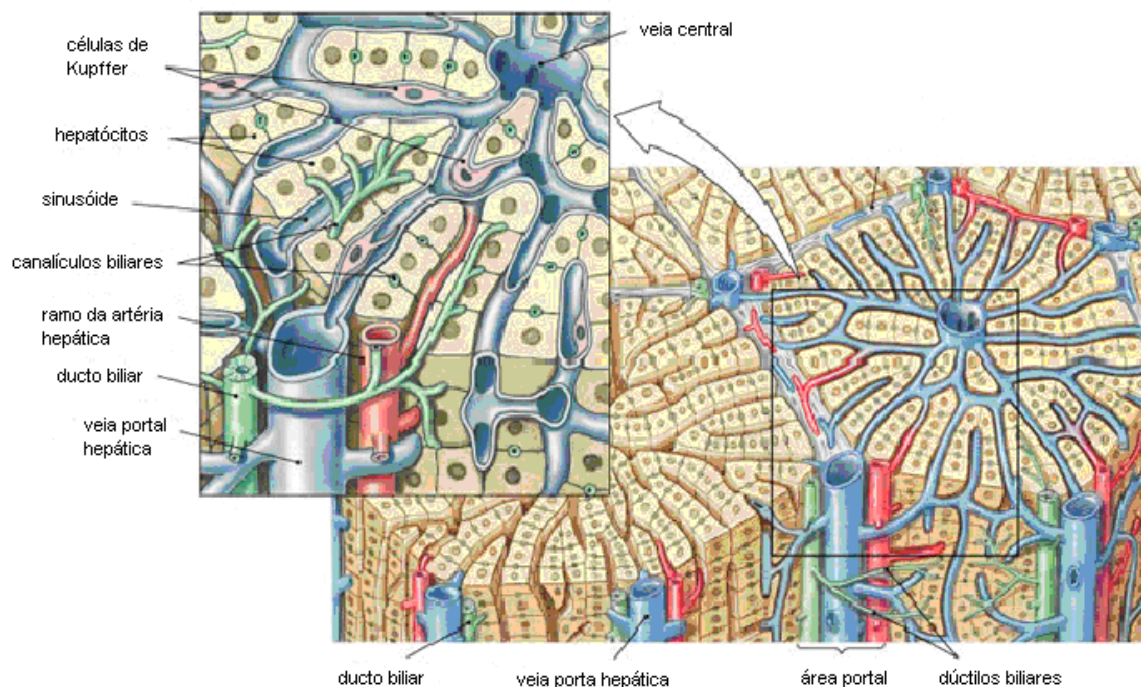


Figura 4 Esquema representativo da organização dos hepatócitos.

1.5 Receptor asialoglicoproteína

Uma outra característica atractiva para a terapia génica é o facto de no fígado ser expresso o receptor asialoglicoproteína (ASGP-R). Este receptor é uma proteína integral da membrana que é especificamente e abundantemente expresso na superfície dos hepatócitos [13]. Este receptor foi inicialmente descoberto por Ashwell e Morell e os

seus colaboradores quando estudavam o metabolismo de glicoproteínas do soro em mamíferos. Neste estudo verificou-se que o tempo de circulação de proteínas que continham oligossacarídeos ligados era drasticamente reduzido quando os resíduos de ácido siálico terminais eram removidos através de um método enzimático. As asialoglicoproteínas (ASGPs) acumulavam-se e eram degradadas no interior das células parenquimatosas do fígado. Verificou-se que existiam os chamados receptores ASGP que reconheciam especificamente as asialoglicoproteínas que tinham resíduos de galactose e Nacetilgalactosamina (monossacarídeo derivado da galactose) nos seus terminais. Este receptor é um membro da família das lectinas tipo C, define-se assim por exigir a presença de cálcio para a ligação do ligando e por conter pontes dissulfeto no domínio do reconhecimento de carboidratos [14]. Em hepatócitos normais os receptores ASGP distribuem-se de uma forma polarizada, localizam-se essencialmente na zona basolateral dos hepatócitos, sendo escassos na zona apical. No caso dos hepatocarcinomas há perda da distribuição polarizada do receptor, distribuindo-se por toda a membrana do hepatócito. Além desta perda de polarização, surge ainda, o aparecimento em enorme quantidade deste receptor no citoplasma dos hepatócitos cancerígenos [15]. O receptor é assim sobreexpresso em hepatócitos cancerígenos. O receptor ASGP é um complexo hetero-oligomérico composto por dois tipos de subunidades homólogas (H1 e H2). As duas subunidades têm 55% de igualdade, cada subunidade é constituída por quatro domínios, um domínio N-terminal citoplasmático, um domínio transmembranar, um segmento extracelular e um domínio de reconhecimento de carboidratos, sendo este último responsável pela ligação ao ligando [16;17].

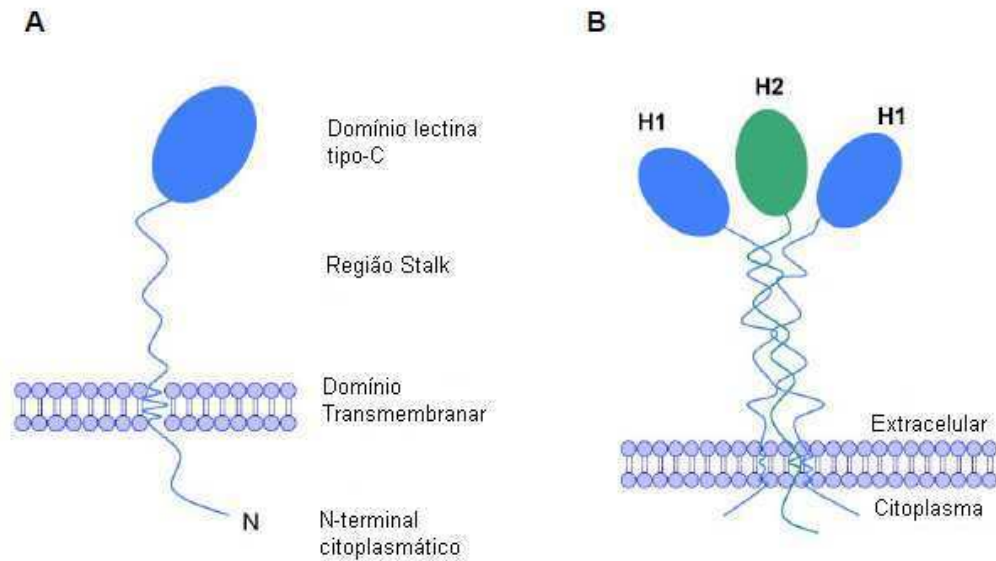


Figura 5 A) Representação esquemática de uma subunidade do ASGP-R. B) Esquema de um complexo hetero-oligomérico de 2 subunidades H1 e uma H2, tamanho mínimo para obter um ASGP-R ativo.

A subunidade H1 tem apenas uma isoforma, enquanto que para H2 foram isoladas, de fígado humano e de células HepG2, três variantes distintas, H2a, H2b e H2c. A isoforma H2a não aparece em receptores nativos. Em contraste, tanto a associação de H1 com H2b ou H2c são encontradas em receptores funcionais. A presença de ambas as subunidades H1 e H2b ou H2c é uma condição prévia para que o receptor de asialoglicoproteínas tenha todas as funcionalidades. No entanto, ambas as subunidades H2b e a H2c não se encontram no mesmo receptor [18]. A estequiometria para o tamanho mínimo de um receptor activo consiste em duas subunidades H1 e uma subunidade H2. Nestas condições o receptor exhibe alta afinidade de ligação para o ligando [19].

1.5.1 Ligandos / Propriedades da ligação ao receptor ASGP

Os receptores asialoglicoproteína ligam especificamente resíduos de galactose e Nacetilgalactosamina que existem nos terminais de glicoproteínas sem resíduos de ácido sialico. Vários estudos têm demonstrado que a afinidade da ligação é altamente dependente do número de galactoses ou Nacetilgalactosamina, da sua distância e do arranjo tridimensional dos açúcares [11; 13].

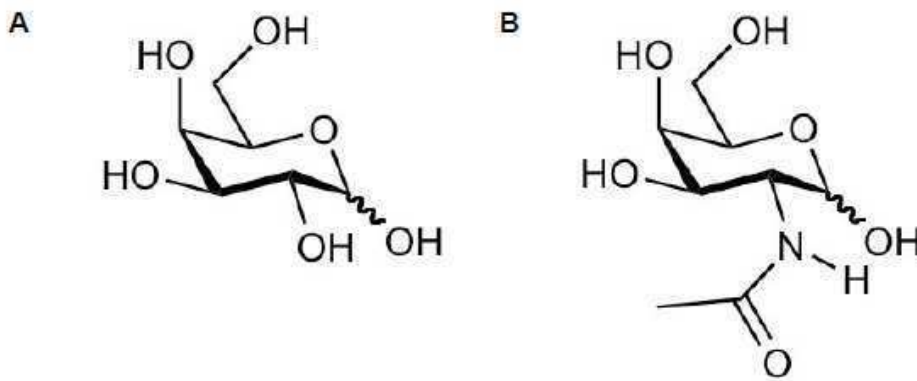


Figura 6 Estrutura de dois monossacarídeos que ligam ao receptor ASGP. A) D-galactose B) Nacetilgalactosamina.

Moléculas com um único resíduo de galactose exibem uma afinidade baixa para o receptor, estes tem uma constante de dissociação da ordem 10^{-3} M, no caso de serem dois resíduos a constante de dissociação é da ordem 10^{-6} M, se forem três resíduos a constante de dissociação passa a ser da ordem dos 5×10^{-9} M, por último de forem quatro resíduos de galactose a constante de dissociação é da ordem dos 10^{-9} M [13]. Posto isto, a ligação de alta afinidade é conseguida através de múltiplas interações entre o local de reconhecimento dos hidratos de carbono do receptor e os resíduos de açúcar. Além disso, o espaçamento entre os açúcares tem se mostrado importante para o reconhecimento destes pelo receptor. Sabe-se ainda que a oxidação dos resíduos de galactose inibe o reconhecimento destes pelo receptor ASGP [20]. Este receptor é importante para a depuração das glicoproteínas em geral, mas é também importante na absorção da imunoglobulina A que é endocitada em hepatócitos. A IgA tem resíduos de galactose e de N-acetilgalactosamina na região da dobradiça. Estes resíduos são reconhecidos pelo receptor ASGP o que leva a endocitose da IgA pelos hepatócitos. Os dois ligandos mais comumente utilizados e melhor caracterizados são o asialo-orosmucoide (ASOR) e a asialofetuina (ASF). Tanto o ASOR como a asialofetuina são duas glicoproteínas [21].

1.5.2 Asialofetuina

A asialofetuina é conhecida como um excelente ligando selectivamente reconhecido pelo ASGP-R, trata-se de uma glicoproteína que deriva da fetuina.

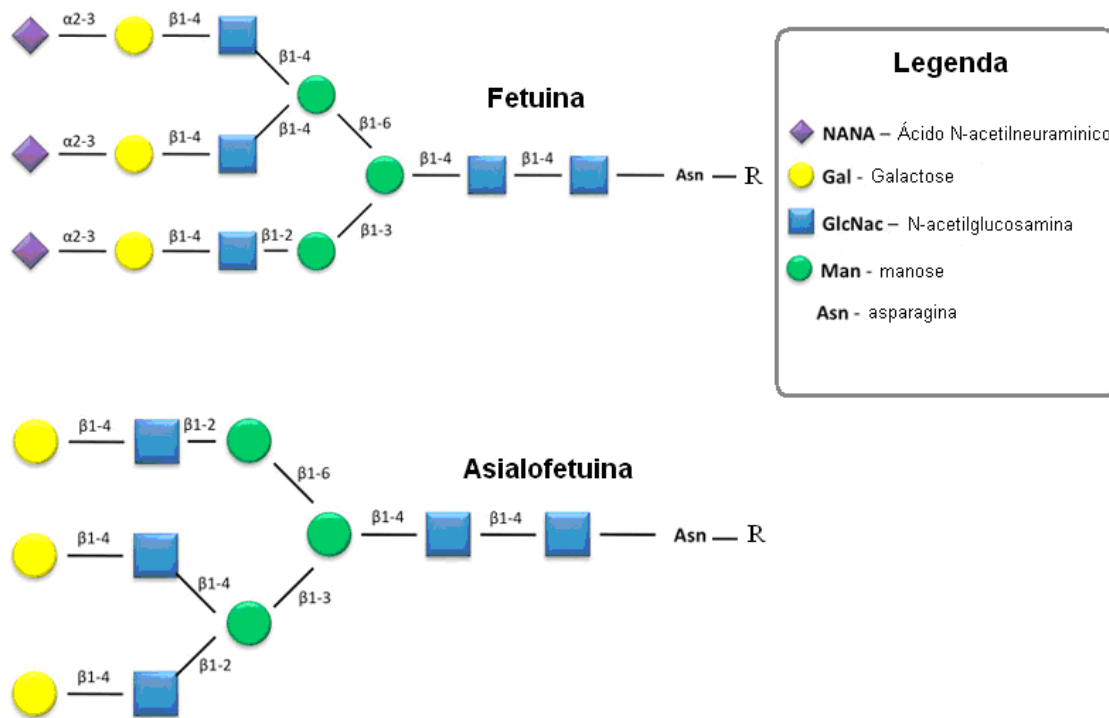


Figura 7 Esquema representativo da estrutura e composição da fetuina e da asialofetuina.

A fetuina representa um grupo de proteína produzidas no fígado e que são secretadas para a corrente sanguínea. Pertencem ao grupo das proteínas transportadoras, no qual o representante mais conhecido é a albumina. A fetuina é a proteína mais abundante no sangue fetal, em quanto que no sangue dos adultos é a albumina. A asialofetuina é então uma glicoproteína de 48kD com carga negativa que possui três antenas formadas por hidratos de carbono que se ligam a uma asparagina da cadeia de aminoácidos. As cadeias de hidratos de carbono têm no seu segmento terminal resíduos de N-acetilgalactosamina [22]. A constante de dissociação da asialofetuina para o receptor ASGP é cerca de 200 vezes menor do que para glicoproteínas com duas antenas de cadeias de hidratos de carbono. Para além disto sabe-se a asialofetuina tem dois ou mais glicanos que se ligam as subunidades hetero-oligoméricas do receptor ASGP facilitando a sua internalização [23].

1.6 Terapia génica

A terapia génica no seu termo mais amplo, consiste no tratamento de doenças ou na correcção de qualquer disfunção do organismo pela introdução de genes funcionais que substituam ou complementem aqueles que se encontram defeituosos. Actualmente, o conceito de terapia génica foi ampliado e inclui o tratamento de doenças infecciosas e do cancro. A terapia génica é hoje em dia a esperança de tratamento para um grande número de doenças que até agora eram consideradas incuráveis por métodos convencionais, que vão das hereditárias e degenerativas às diversas formas de cancro e doenças infecciosas [24]. A terapia génica pode ser dividida em dois ramos, somático e germinal, dependendo do tipo de células ou tecidos alvo a que se destina. A abordagem germinal tem como alvos os tecidos ou as células germinais, em quanto que a abordagem somática foca-se no corpo, ou seja, tenta corrigir um fenótipo doente mediante o tratamento de algumas células somáticas do indivíduo afectado. Este processo é similar ao transplante de um órgão, ou seja, pode curar o indivíduo em causa mas o mecanismo responsável pela cura não é transmitido à descendência como no caso da terapia génica germinal. Além disso, muitas vezes é possível reverter os efeitos da terapia génica somática através de cirurgia ou tratamento com radioterapia ou quimioterapia. Em quanto que na terapia génica germinal, isso não é possível, a terapia génica germinal possui um efeito sistémico e irreversível, pelo que qualquer erro pode afectar o desenvolvimento, a diferenciação celular, o crescimento e muitos aspectos do comportamento e fisiologia do paciente. Deste modo todas as terapias genéticas realizadas até agora em humanos foram dirigidas a células somáticas, em quanto que a engenharia de células germinativas continua altamente controversa.

1.7 Métodos em terapia genica

Em terapia genica, o tratamento de uma determinada doença é realizada pela transferência de material genético para as células alvo. Existem dois tipos diferentes de material genético, o ADN ácido desoxirribonucleico e o ARN ácido ribonucleico. Devido as características do material genético a sua transferência para as células alvo

necessita do auxílio de um vector. O material genético possui carga negativa o que dificulta não só a sua interacção com a membrana celular como a própria passagem através desta para que ocorra a sua entrada na célula, para além disto o material genético é ainda muito vulnerável à degradação por nucleases. Por estes motivos se torna necessário a utilização de um vector que permita não só uma melhor internalização do material genético pela célula como assegure a protecção deste das nucleases. Existem assim uma grande variedade de métodos utilizados em terapia genica de forma a obter a melhor eficiência de entrega de material genético às células alvo. A escolha do método depende, principalmente, da natureza do tecido alvo e da estratégia que se pretende utilizar. Hoje em dia os vectores virais são os mais utilizados seguidos dos lipossomas. Os métodos utilizados pela terapia génica podem ser divididos em três grandes grupos, métodos físicos, biológicos e químicos. No caso dos métodos físicos usados na terapia genica destaca-se o bombardeamento de partículas, a microinjecção e a electroporação. Este tipo de métodos é normalmente usado em culturas de tecidos, caracteriza-se pela utilização do material genético “nu”. O bombardeamento de partículas é o método físico mais usado, utilizam-se micropartículas de ouro revestidas de ADN. Este método é bastante utilizado para fazer transfecções ao nível do músculo e da pele, embora provoque uma lesão celular e a expressão seja transiente [25]. A microinjecção consiste na injecção directa do ADN na célula. Esta técnica é comumente utilizada nos ensaios laboratoriais de terapia genica germinal. No caso da electroporação, utilizam-se impulsos eléctricos para permeabilizar a membrana celular de forma a permitir a entrada do material genético [26].

Os vírus, após sofrerem modificações no seu genoma, podem ser convertidos em vectores de transporte de genes para células humanas. Para que isto seja possível é necessário remover os genes do vírus causadores da doença e de seguida introduzir os genes que produzam o efeito que se pretende. Hoje em dia é utilizada uma enorme variedade de vírus como métodos biológicos na terapia genica, sendo os mais utilizados os adenovirus, os retrovírus, o vírus adeno-associado e o vírus Herpes Simplex [25]. O adenovirus apresenta o material genético sob a forma de dupla-hélice, causam normalmente infecções respiratórias, intestinais e oculares. Quando há infecção o vírus deposita o material genético dentro da célula, mas este não é incorporado no genoma da célula hospedeira. No caso dos retrovirus, o seu material genético está na forma de ARN. Quando este tipo de vírus infecta uma célula hospedeira, para além de introduzir o seu ARN, introduz também algumas enzimas na célula. O material genético deste tipo

de vírus é incorporado nos cromossomas da célula, ou seja, o material genético do vírus fica a fazer parte do material genético da célula hospedeira, diz-se que a célula hospedeira está modificada por conter um novo gene. Caso esta célula se divida posteriormente à infecção, todas as suas descendentes conterão os novos genes. O vírus adeno-associado é também um vírus utilizado como vector de transporte de genes em terapia genica. São vírus pequenos com o material genético de ADN cadeia simples, sendo que o tipo selvagem deste vírus podem introduzir o material genético num local específico no cromossoma 19, porém, o AAV recombinante, que não contém quaisquer genes virais, apenas os genes terapêuticos, não consegue fazer a integração no genoma do hospedeiro. No caso do vírus Herpes simplex, é um vírus humano neurotrópico. É utilizado principalmente como vector de entrega de genes para o sistema nervoso. O vírus na sua forma selvagem é capaz de infectar neurónios.

Existem ainda os métodos químicos, estes apresentam algumas vantagens em relação aos métodos biológicos, nomeadamente a possibilidade de produção em larga escala e a sua baixa imunogenicidade. Pretende-se que os métodos químicos façam a condensação do material genético de forma a protege-lo contra a acção das nucleases. Para além disso é necessário que estes métodos químicos tenham farmacocinéticas e biodistribuições adequadas. É necessário ainda que ocorra um reconhecimento específico das células alvo e que exista uma libertação eficiente do material genético no citoplasma. Por fim, o material genético terá de efectuar a translocação para o núcleo de uma forma correcta para que ocorra a expressão génica pretendida. Dos métodos químicos fazem parte, entre outros, os polímeros catiónicos e os lipossomas catiónicos. Os lipossomas catiónicos e os polímeros catiónicos têm carga superficial positiva e da interacção com o ADN, que tem carga negativa, resulta os chamados lipoplexos e poliplexos, respectivamente. Os polímeros catiónicos podem ser divididos em dois grupos, polímeros naturais e polímeros sintéticos, sendo ambos caracterizados por uma fácil preparação e purificação. Os lipossomas catiónicos são geralmente compostos por lípidos carregados positivamente e por lípidos auxiliares com carga neutra. Os lípidos auxiliares promovem a formação da bicamada lipídica, conferem fusogenicidade adicional aos lipossomas e estabilidade aos lipoplexos. Os lípidos catiónicos são normalmente compostos por um grupo com carga positiva ligado a uma âncora hidrofóbica. A presença de uma carga positiva, promove a sua interacção do lípido com ADN carregando negativamente o que leva à formação de complexos condensando o

ADN. Ambos os sistemas apresentam uma grande versatilidade quer química quer estrutural e também uma elevada estabilidade.

1.7.1 Lipossomas catiónicos

A composição lipídica dos lipossomas catiónicos decide a sua maior ou menor actividade biológica, torna-se então fulcral a escolha apropriada quer do lipido catiónico quer do lipido auxiliar, para obter uma excelente actividade biológica. Sabe-se que um lipido catiónico com um maior número de cargas positivas aumenta a capacidade deste para condensar e proteger o ADN, no entanto um aumento progressivo de cargas positivas pode resultar em uma interacção muito forte com o ADN que prejudica a sua dissociação subsequentemente. Além disto lipidos catiónicos com numerosas cargas positivas são mais propensos a formar micelas, o que pode levar ao desenvolvimento de complexos menos estáveis e mais tóxicos [27]. Em geral a actividade da transfecção dos lipidos catiónicos diminui com o comprimento da cadeia hidrocarbonada e aumenta com a saturação [27]. Trabalhos recentes têm também demonstrado que a escolha do lipido auxiliar pode ditar a estrutura e a actividade dos lipossomas catiónicos complexados com o ADN.

Numerosos trabalhos tem sido dedicados à síntese de novos lipidos cationicos e à selecção de diferentes lipidos auxiliares com o objectivo de melhorar a actividade biológica dos lipoplexos. O 1,2-dioleoil-3-(trimetilammonium)propano (DOTAP) é um dos lipidos catiónicos mais utilizados na produção de lipossomas cationicos. Recentemente começou a ser utilizado o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC) que evidenciou uma maior actividade biológica comparado com DOTAP [28]. O EPOPC, um derivado catiónico da fosfatidilcolina, é composto apenas por metabolitos celulares normais ligados por ligações éster, exibindo desta forma uma baixa toxicidade e sendo, consequentemente, adequado para aplicações clínicas de terapia genica.

A dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), é um dos lipidos auxiliares mais utilizados para produção de lipossomas cationicos, uma vez que pode facilitar a fusão com a membrana e/ou a desestabilização da membrana do endossoma, promovendo assim a

libertação do material genético no interior da célula. Contudo, quando se pretende uma aplicação intravenosa, a substituição do DOPE por colesterol melhora de uma forma significativa a capacidade de transfecção dos lipoplexos. Isto deve-se ao facto do colesterol promover uma maior estabilidade da bicamada lipídica na presença de soro que o DOPE, resultando em lipoplexos com maior actividade biológica [29]. Estudos recentes demonstraram que lipossomas catiónicos compostos por EPOPC e colesterol, numa razão molar (1:1), constituem um sistema de transporte e entrega de genes bastante eficiente. Os complexos preparados com estes lipossomas resultaram em níveis de transfecção muito superiores aos obtidos com os lipoplexos preparados com lipossomas compostos por DOTAP e colesterol, numa razão molar (1:1) [28]. Por outro lado, verificou-se que a actividade biológica dos complexos, preparados com lipossomas catiónicos compostos por EPOPC:Colesterol, era substancialmente aumentada quando a estes era associada albumina do soro humano, tendo-se constatado esse aumento mesmo na presença de soro [29]. Estes estudos evidenciam que a utilização de lipossomas catiónicos compostos por EPOPC:Colesterol numa razão molar (1:1) poderá ser uma escolha favorável, para conseguir obter actividades biológicas consideráveis.

1.8 Interação do lipoplexo com a célula

Apesar do amplo uso dos lipossomas catiónicos para a entrega de genes quer *in vitro* quer *in vivo*, os mecanismos pelos quais o ADN é entregue às células ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que a eficiência da entrega dos genes mediada pelos lipossomas catiónicos depende fortemente das propriedades físico-químicas dos lipoplexos, nomeadamente o tamanho, a morfologia, a carga superficial, a estabilidade e a sua capacidade de protecção do ADN. Estas características físico-químicas são determinadas por parâmetros como a natureza dos lípidos catiónicos e auxiliares, a estequiometria de lípido catiónico e ADN, a estrutura do ADN, o modo de preparação dos lipoplexos e a natureza do meio em que estes são preparados [30].

Vários estudos têm demonstrado que os proteoglicanos sulfatados ancorados a membrana celular funcionam como receptores para os lipoplexos carregados

positivamente. Os proteoglicanos são proteínas extracelulares ligadas a glicosaminoglicanos que são estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados. Os proteoglicanos possuem uma elevada carga negativa. Sabe-se que eles estão envolvidos em uma grande variedade de processos celulares, que desempenham um papel importante na ligação e internalização de muitos vírus nas células. Estudos envolvendo abordagens que levam a redução dos proteoglicanos fornecem evidências de que os proteoglicanos desempenham um papel na ligação dos lipoplexos. Pensa-se ainda que a ligação de partículas catiónicas aos proteoglicanos presentes na superfície celular é necessária para que ocorra a sua internalização [30]. Na maioria das vezes, para potenciar a internalização dos lipoplexos são lhes associados peptídeos, proteínas ou anticorpos direccionados para receptores que promovem a endocitose dos lipoplexos e conseqüentemente o aumento da sua actividade biológica. Vários estudos têm demonstrado que a associação da albumina ao lipoplexos parece ser uma estratégia promissora, uma vez que há um aumento da expressão do transgene. Este aumento da expressão do transgene tem ocorrido para diferentes tipos de células, mesmo na presença de soro [29; 31]. Uma das causas apontadas para este aumento da eficiência da transfecção é o facto de ocorrer uma ligação inespecífica da albumina dos lipoplexos aos receptores da superfície celular análogos aos receptores scavenger que vão mediar a endocitose destes lipoplexos resultando numa melhoria da transfecção.

1.8.1 Mecanismos de internalização dos lipoplexos

A endocitose foi reconhecida como sendo a principal via de internalização dos lipoplexos [32]. Embora se tenha demonstrado que a endocitose é necessária para a transfecção eficiente dos lipoplexos, não é ainda precisa qual das vias endocíticas está envolvida. A endocitose pode ocorrer através de diversos mecanismos, geralmente estão divididos em duas categorias principais são elas a fagocitose, que está restrita a células especializadas, e a pinocitose que ocorre em todas as células. A pinocitose engloba macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolis e endocitose independente de clatrina e caveolis. O tamanho ou a dimensão dos lipoplexos são um dos parâmetros críticos que regulam a sua captação celular [33]. Na

ausência de qualquer ligando, o tamanho da partícula por si só pode determinar o percurso de internalização e da subsequente transformação intracelular. Sabe-se que as partículas de tamanho inferior a 200nm entram por endocitose mediada por clatrina e chegam rapidamente ao lisossoma, em quanto que partículas com dimensões superiores a 200nm mas inferiores a 1µm são internalizadas preferencialmente por endocitose mediada por caveolis.

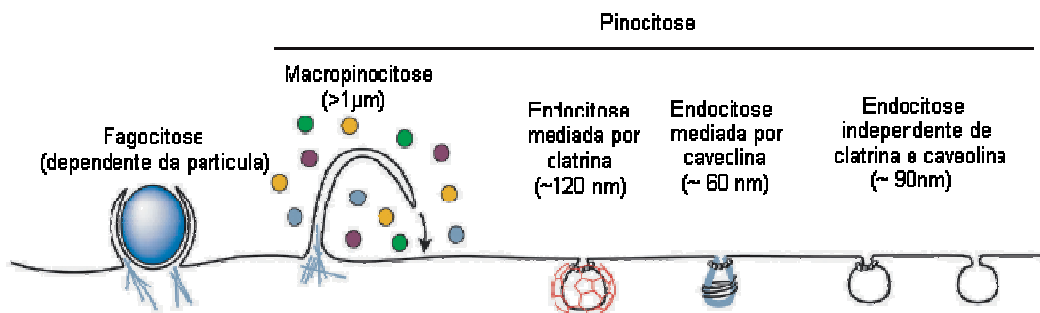


Figura 8 Esquema representativo das diferentes vias endocíticas. Adaptado de Simões S. [30]

Pensa-se que a lenta cinética de internalização nesta via confere uma maior possibilidade de fuga do lipoplexo antes de alcançar o lisossoma, diminuindo assim a degradação lisossomal. Desta forma se pode explicar o facto de lipoplexos de tamanhas maiores do que 200nm terem uma melhor eficiência de transfecção [34].

1.8.2 Mecanismo de fuga do lipoplexo do endossoma.

A seguir à internalização celular dos lipoplexos, torna-se de extrema importância que ocorra a sua libertação da via endocítica para evitar a degradação do ADN ao nível do lisossoma. O modelo mais aceite entre a comunidade científica é o de que, muito provavelmente, ocorre um flip – flop dos lipídios aniónicos do folheto citoplasmático para o folheto lumemal da membrana do endossoma, seguindo-se a interacção dos lipídios aniónicos do folheto lumemal da membrana do endossoma com os lipídios catiónicos dos lipoplexos. Esta interacção poderá resultar na desestabilização da membrana do

endossoma e na descondensação do material genético dos lipoplexos ocorrendo assim a liberação do ADN para o citoplasma [30].

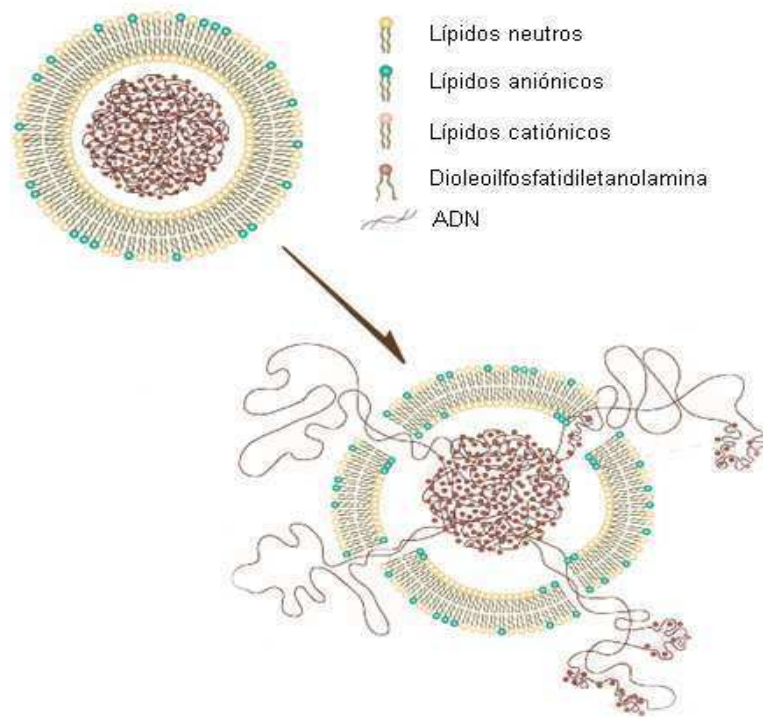


Figura 9 Esquema representativo do flip-flop dos lípidos aniônicos do folheto citoplasmático para o folheto luminal da membrana do endossoma e liberação do material genético da via endocítica. Adaptado de Simões S. [30]

Para além de existência deste flip – flop dos lipídios aniônicos do folheto citoplasmático para o folheto luminal da membrana do endossoma, vários estudos tem demonstrado que a adição de determinado tipo de moléculas aos lipoplexos pode facilitar a fuga do ADN da via endocítica. Vários estudos tem evidenciado que a albumina pode facilitar a fuga do ADN da via endocítica, uma vez que a albumina tem sido descrita como sendo capaz de sofrer uma mudança conformacional com uma baixa de pH, adquirindo propriedades fusogénicas [35; 36].

1.8.3 Mecanismo de entrada do ADN para o núcleo

O ADN libertado no citoplasma tem que entrar no núcleo para ser transcrito, tendo portanto que ultrapassar a membrana nuclear. Em linhas celulares, onde ocorre uma divisão activa, o material genético exógeno tira partido da ruptura da membrana nuclear,

durante a mitose, para entrar no núcleo de forma a ser transcrito. No entanto, o processo de entrada de ADN no núcleo durante a ausência de divisão celular continua por esclarecer. O mecanismo mais provável parece ser o de que ocorre uma associação inespecífica do ADN com proteínas ou peptídeos que contenham o sinal de localização nuclear (NLS) ou então com os seus receptores karyopherin- α/β , havendo assim a importação do material genético para o núcleo por um processo de transporte activo [30].

1.9 Métodos utilizados em terapia génica no tratamento de HCC

Na tentativa de gerar uma estratégia terapêutica eficiente, que resulte na redução da mortalidade associada ao hepatocarcinoma, tem-se procurado desenvolver novos protocolos terapêuticos envolvendo a entrega de material genético às células alvo através de diferentes sistemas de transporte e entrega de ácidos nucleicos. Vários estudos têm envolvido a utilização de vírus adeno-associado para entrega de genes ao fígado, tendo sido o sorotipo 2 (AAV2) e o sorotipo 8 (AAV8) considerados sistemas de entrega de material genético altamente eficientes [37; 38]. Contudo, a sua aplicação tem sido limitada, uma vez que estes vectores induzem uma resposta do sistema imunitário, provocando uma rejeição rápida das células que sofreram transdução [39]. Para superar este problema têm sido desenvolvidos outro tipo de vectores utilizando métodos físicos e químicos. O bombardeamento de partículas e a electroporação têm sido dois dos métodos físicos utilizados na tentativa de criar protocolos alternativos à utilização de vectores virais [40; 41]. No entanto, apesar de estas técnicas serem comumente utilizadas em culturas de tecidos, existe ainda uma grande dificuldade em torna-las aptas para utilização *in vivo*. Do mesmo modo os polímeros catiónicos têm também sido vastamente estudados e explorados na tentativa de criar um excelente vector de entrega de material genético para o fígado. O polímero catiónico polietilenimina (PEI) associado covalentemente ao polietilenoglicol demonstrou ter uma grande capacidade bem como alguma especificidade da expressão do transgene para o hepatocarcinoma, mas também aqui existem obstáculos. O polímero catiónico polietilenimina associado covalentemente ao polietilenoglicol apresenta citotoxicidade embora que não seja uma

toxicidade aguda [42]. O facto deste vector apresentar citotoxicidade torna-se um obstáculo para poder utilizar esta estratégia como um tratamento em pacientes com hepatocarcinoma. Embora tenha sido feita uma vasta pesquisa na busca de um vector, que torne a entrega do material genético eficiente e específico para as células cancerígenas do fígado, ainda existe um vasto caminho a percorrer para alcançar uma estratégia adequada.

1.10 Objectivo

O hepatocarcinoma é um tumor altamente maligno sendo o terceiro tipo de cancro que causa maior mortalidade a nível mundial. As opções de tratamento actuais apresentam múltiplas limitações e não são, na grande maioria dos casos, capazes de eliminar a patologia. Desta forma existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas estratégias antitumorais, direccionadas para o HCC, que apresentem uma elevada eficiência de forma a combater os altos níveis de mortalidade.

A terapia génica apresenta-se como uma estratégia promissora para o tratamento do cancro, contudo a sua aplicação clínica ainda se encontra bastante limitada, nomeadamente devido à reduzida eficiência de entrega de material genético às células alvo. Deste modo, o objectivo principal deste trabalho consistiu em desenvolver um novo sistema de transporte e entrega de material genético, baseado em lipossomas catiónicos e em asialofetúina, que apresentasse elevada eficiência e especificidade para células de hepatocarcinoma. Pretendeu-se assim avaliar a eficiência e selectividade de novos sistemas de transporte e entrega de material genético para as células de hepatocarcinoma e comparar estes novos sistemas com os melhores sistemas de transporte actualmente existentes. Tinha-se também como propósito compreender os mecanismos envolvidos na actividade biológica apresentada pelo novo sistema de transporte, bem como averiguar a sua capacidade de protecção do material genético.

Materiais e Métodos

2.1 Cultura da linha celular HepG2 e Hela

A linha celular HepG2 foi obtida pela primeira vez a partir do tecido hepático de um jovem de 15 anos de sexo masculino, caucasiano americano. Esta linha celular tem uma morfologia de células epiteliais, libertando uma grande diversidade de proteínas plasmáticas cruciais, tais como a albumina e a transferrina. Estas células expressam à sua superfície o receptor ASGP, constituindo, desta forma, um bom modelo para o estudo do hepatocarcinoma.

O meio utilizado para a cultura da linha celular HepG2 foi o DMEM-HG (“Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose”) (Sigma). Este meio foi suplementado com 10mM de Hepes, 12mM de bicarbonato de sódio 10% de FBS (soro bovino fetal), bem como com 100 unidades/ml de penicilina e 0,1mg/ml de estreptomicina. As células foram cultivadas com este meio numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera com 5% de dióxido de carbono.

Estas células crescem em monocamada e, como tal, quando atingem aproximadamente os 100% de confluência, habitualmente duas vezes por semana, são diluídas em meio de cultura. Para isso após remoção e descarte do meio de cultura, lavaram-se as células com aproximadamente 4 ml de meio de dissociação, de forma a remover completamente o meio de cultura e incubaram-se as células com 3 ml de solução de tripsina, durante aproximadamente 5 minutos, para as destacar do fundo do frasco. Em seguida, adicionaram-se 7 ml de meio de cultura para inibir o efeito da tripsina e procedeu-se à homogeneização da suspensão celular para desfazer os agregados celulares. A diluição para efectuar as subculturas foi aproximadamente 1:5. Aos novos frascos das subculturas adicionou-se meio de cultura para perfazer 20ml. As subculturas foram a incubar a 37°C numa atmosfera de 5% de dióxido de carbono.

A linha celular Hela é uma linha celular de um carcinoma do colo uterino. O procedimento para manter em cultura a linha celular Hela foi idêntico ao utilizado para a linha celular HepG2. A diferença na cultura destas duas linhas celulares residiu na diluição das subculturas que neste caso foi aproximadamente 1:10.

2.2 Preparação de lipossomas catiónicos

As vesículas unilamelares pequenas (SUV) compostas por EPOPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina) e colesterol (Avanti Polar Lipids), numa razão molar de 1:1, foram obtidas por extrusão de lipossomas multilamelares (MLV). Inicialmente foi lavado um pequeno tubo de vidro 3 vezes com clorofórmio de forma a retirar todos os resíduos que poderiam estar nas paredes do tubo. Em seguida foram colocados no tubo os volumes adequados de EPOPC e colesterol, retirados do respectivo stock preparado em clorofórmio e armazenado a -20°C, de forma a termos uma razão molar de 1:1. Procedeu-se depois à evaporação do clorofórmio, num evaporador rotativo Heidolph vv 2000, para que se formasse um filme lipídico no fundo do tubo de vidro. Após a evaporação completa do clorofórmio e formação do filme lipídico, adicionou-se 1ml de água MiliQ e efectuou-se a agitação em vortéx para proceder à hidratação do filme lipídico e obtenção dos lipossomas multilamelares. Em seguida sujeitou-se a suspensão a uma sonicação de 4 minutos e procedeu-se à extrusão dos lipossomas, através de duas membranas de policarbonato com poros de 50nm, tendo-se utilizado um extrusor Avestin (Avestin, Toronto, Canadá). A extrusão da suspensão lipossómica consistiu em 21 passagens através das membranas de policarbonato, de modo a garantir a obtenção de uma suspensão homogénea de vesículas pequenas unilamelares (SUV). Os lipossomas foram depois diluídos quatro vezes, com água MiliQ, e esterilizados por filtração, utilizando filtros cujo diâmetro do poro era de 0,22µm (Schleicher & Schuell BioScience) [28; 29]. Os lipossomas foram guardados e armazenados a 4°C até posterior utilização.

Para efectuar estudos de ligação e internalização preparam-se lipossomas catiónicos contendo rodamina-PE (rodamina dioleoilfosfatidiletanolamina). Neste caso os lipossomas eram constituídos por 50% de EPOPC, 50% de Colesterol e 1% de rodamina-PE [28]. A produção deste tipo de lipossomas fez-se de acordo com o protocolo descrito anteriormente, apenas se teve em conta que neste caso, os lipossomas deviam estar protegidos da luz. Os lipídios utilizados foram provenientes da Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL.

2.2.1 Determinação da concentração lipídica

O processo de extrusão para formar vesículas unilamelares pequenas, é um processo onde ocorre a perda de lipido. Desta forma, a concentração final dos lipidos é geralmente diferente da inicial, tornando-se então necessário a quantificação da concentração do teor lipídico no final da preparação dos lipossomas. Neste caso optou-se por quantificar a concentração de colesterol, uma vez que se trata de um método simples e rápido. Como os lipossomas são preparados com uma razão molar de 1:1, a concentração de colesterol é igual à concentração de EPOPC. Por sua vez, a concentração de EPOPC dá-nos a concentração de cargas positivas, uma vez que cada molécula de EPOPC tem apenas uma carga positiva e o colesterol é um lípido neutro.

A quantificação do colesterol foi feita através do método de Liebermann-Burchard, que é um método colorimétrico. Fez-se a preparação de um reagente (reagente de colesterol) que consistiu em adicionar ácido anídrico a ácido glacial acético, em seguida acrescentou-se à mistura ácido sulfúrico. Para que a mistura de ácidos se mantivesse estável juntou-se por fim sulfato de sódio. A preparação deste reagente deve ser feita na hotte e os recipientes dos ácidos devem estar em gelo, uma vez que a reacção entre estes ácidos é uma reacção muito exotérmica. Este reagente foi armazenado a 4°C num frasco de vidro.

Para fazermos a quantificação do colesterol, colocaram-se 50µl da amostra de lipossomas, preparada anteriormente, num tubo de vidro. Para fazer a curva de calibração, foram colocados 50µl de soluções com concentrações conhecidas de colesterol (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1mg/ml) em tubos de vidro. Foi depois adicionado a cada tubo de vidro 1,5ml do reagente de colesterol. Para cada concentração de colesterol conhecida e para a amostra foram feitas réplicas. Após a adição do reagente de colesterol taparam-se os tubos fez-se um breve vortéx, seguido de uma incubação durante 20 minutos a 37°C. A seguir a esta incubação foram feitas as leituras de absorvância a 625nm num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Divices). O reagente de colesterol reage com o grupo OH do colesterol o que leva ao aparecimento de uma cor azul, que é tanto mais intensa quanto maior a concentração de colesterol. Há uma relação linear entre a concentração de colesterol e a absorvância a 625nm.

2.3 Preparação dos lipoplexos

Os lipoplexos foram preparados em HBS (100mM de NaCl, 20mM de HEPES com um pH de 7.4) a partir de suspensões de lipossomas, de concentração conhecida, e de soluções de ADN (em HBS) com uma concentração de 10 µg/ml. O volume de lipossomas que se utilizou variava consoante a concentração obtida e com a razão de carga (+/-) que se pretendia alcançar entre o lipido e o ADN. Após a adição dos lipossomas à solução salina de HBS (100µl/µg de ADN) foi feita uma ligeira agitação. Em seguida foram adicionados 100µl de uma solução de HBS contendo 1µg do plasmideo que codificava a luciferase, pCMVluc (que foi oferecido pelo Dr. P. Felgner, Vical, San Diego, CA), ou contendo 1µg do plasmideo que codificava uma proteína verde fluorescente (GFP), pCMVgfp (Clontech). Fez-se uma breve agitação após a adição do ADN e deixou-se a mistura a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente [28].

No caso dos lipoplexos contendo albumina (Sigma Addrich), a mistura dos lipossomas, com HBS e com albumina (32µg/µg de ADN) foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o ADN e efectuou-se uma nova incubação de 15 minutos também à temperatura ambiente [28].

Em relação aos lipoplexos contendo asialofetúina (Sigma Addrich), a mistura dos lipossomas com HBS foi, tal como para a albumina, incubada com asialofetúina (5µg, 10µg, 20µg ou 50µg/µg de ADN) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se de seguida o ADN e efectuou-se uma nova incubação de 15 minutos também à temperatura ambiente. No caso da produção dos complexos com lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) foram adicionados 50µl de OPTIMEM (meio recomendado para preparação de complexos com lipofectamina™ 2000) a 1µg de ADN. Separadamente adicionou-se 50µl de OPTIMEM a 2,5µl de lipofectamina, fez-se uma incubação de 10 minutos e posteriormente misturam-se as duas fracções, tendo-se efectuado uma incubação de 20 minutos. Os lipoplexos foram imediatamente utilizados após serem preparados. Os lipoplexos utilizados nos estudos de transfecção foram preparados com soluções estéreis e a sua produção foi feita na câmara de fluxo.

2.4 Preparação das células para os estudos de transfecção

Para fazer os estudos de transfecção foram utilizadas células com uma confluência de aproximadamente 80%, para garantir que as células são plaqueadas na fase exponencial de crescimento. O procedimento inicial utilizado para plaquear células foi idêntico ao processo utilizado na subcultura. No caso das células para plaquear, após a adição do meio de cultura, para inibir/diluir a tripsina, e a subsequente homogeneização, procedeu-se à contagem das células, com auxílio de um hemocitómetro, por forma a determinar a densidade da suspensão celular. Para os estudos de actividade biológica dos lipoplexos, envolvendo a luciferase, foram plaqueadas 80×10^3 células HepG2 por poço, em placas de 48 poços. No caso da linha celular Hela, foram plaqueadas 40×10^3 células por poço, também em placas de 48 poços.

Nos estudos de transfecção envolvendo a GFP, foram plaqueadas 320×10^3 células HepG2 por poço, em placas de 12 poços. Nos ensaios de microscopia de fluorescência foram colocadas lamelas das placas de 12 poços antes de serem plaqueadas as células. Em todos os ensaios as células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção e todo o procedimento foi feito na câmara de fluxo.

2.5 Actividade Biológica

2.5.1 Avaliação da expressão da luciferase

Para efectuar o ensaio de actividade biológica com os lipoplexos preparados com o plasmideo que codificava a luciferase, foi primeiramente aspirado o meio em que as células se encontravam e colocados 300µl de meio DMEM-HG, com ou sem soro (dependendo do ensaio que se pretendia fazer). Nos estudo em que se ambicionava ver o efeito da galactose na transfecção foram adicionadas as quantidades de galactose desejadas aos 300µl de meio. A galactose foi adicionada 30 minutos antes da adição dos lipoplexos. Foram depois colocados os 200µl de lipoplexos, contendo 1µg de ADN, em cada poço. As células foram de seguida deixadas a incubar durante quatro horas, a 37°C, numa atmosfera com uma concentração de dióxido de carbono de 5%. Após as quatro horas, foi substituído o meio contendo os lipoplexos por 1ml de meio DMEM-HG e as

células foram deixadas a incubar durante 48 horas, nas condições de cultura acima referidas. Após as 48 horas de incubação foi feito o teste de viabilidade celular, para verificar se existia alguma citotoxicidade associada à transfecção.

A seguir à avaliação da viabilidade celular as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) e lisadas com 150µl de tampão de lise (1 mM DTT, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-fosfato, 8 mM MgCl₂, 15% glicerol e 1% (v/v) Triton X- 100, pH de 7,8). Assim que se verificou o destaque dos fragmentos celulares, a placa foi colocada a -80°C durante pelo menos 15 minutos, para ajudar a lise celular, antes de ser avaliada a produção de luz pela luciferase.

Para avaliar o nível de expressão de luciferase foram descongeladas as placas e transferidos os conteúdos de cada poço para “eppendorfs” colocados previamente em gelo. Em seguida, efectuou-se uma centrifugação, de 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C na centrífuga ScanSpeed 1730MR. Foram depois transferidos 50µl do sobrenadante de cada eppendorf para uma placa de 96 poços, a qual foi mantida em gelo até à leitura. Neste ensaio, utilizou-se uma solução de luciferina (167µM), previamente aquecida a 37°C, e tampão de leitura (1 mM DTT, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-fosfato, 8 mM MgCl₂, 15% glicerol e 1% (v/v), pH de 7,8), também previamente aquecido a 37°C, ao qual se adicionou ATP (numa concentração de 2mM) imediatamente antes do início da leitura. O “software” do aparelho foi preparado para adicionar 100µl de cada uma destas soluções a cada poço da placa. Imediatamente antes de colocar a placa no luminómetro, esta foi aquecida, durante 30 segundos, num banho a 37°C. A medição da luz produzida pela luciferase existente em cada amostra foi feita no luminómetro LMax II 384 (Molecular Devices) [28; 29].

O teor de proteína dos lisados celulares foi avaliado utilizando o reagente Dc Protein Assay (Bio-Rad) e usando albumina do soro bovino como padrão. A proteína foi quantificada utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, colocou-se numa placa de 96 poços transparente 5µl do sobrenadante de cada amostra bem como das amostras padrão. Em seguida foi preparado o reagente A', que consiste em adicionar 20µl do reagente S para cada ml de reagente A que sejam necessários para a quantificação. Após a preparação do reagente A', foram adicionados 25µl deste a cada poço e em seguida 200µl do reagente B. Após 15 minutos de incubação foi feita a leitura da absorvância a 750nm no espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices). Verificou-se a existência de uma relação linear entre a concentração de proteína e a absorvância lida a 750nm. Deste modo, foi possível criar

uma equação, utilizando os valores obtidos para as amostras padrão, que relacionava a absorvância com a concentração de proteína. Os valores de actividade biológica dos lipoplexos foram expressos em termos de luciferase (RLU)/proteína (mg) para cada amostra.

2.5.2 Avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo

A eficiência de transfecção dos lipoplexos foi avaliada através da determinação da percentagem de células que expressavam GFP. Para isso, antes da incubação das células com os lipoplexos preparados com o plasmídeo que codificava a GFP, o meio em que as células se encontravam foi aspirado e substituído por 1200µl de meio de cultura DMEM-HG com soro. Nos estudos em que se pretendia ver o efeito da galactose na eficiência da transfecção dos complexos, foi adicionada a quantidade necessária de galactose, proveniente de uma solução stock, aos 1200µl de meio de cultura existentes em cada poço de forma a obter uma concentração final de galactose de 40mg/ml. Trinta minutos após a adição de galactose, foi colocado em cada poço o volume de lipoplexos correspondente a 4µg de ADN. As células foram de seguida incubadas durante quatro horas, a 37°C, numa atmosfera com uma concentração de dióxido de carbono de 5%. Após estas quatro horas, foi substituído o meio contendo os lipoplexos por 3ml de meio de cultura e as células foram deixadas a incubar mais 48 horas, nas condições de cultura acima referidas. Após as 48 horas de incubação, foi aspirado o meio de cultura e feita uma lavagem com PBS. Em seguida foram adicionados a cada poço 250µl de tripsina e incubou-se a 37°C, durante aproximadamente 3 minutos, para facilitar a acção da tripsina. Após o destacamento das células, foram adicionados a cada poço 500µl de meio de cultura a 4°C e homogeneizou-se a suspensão para que não existissem agregados celulares. O conteúdo de cada poço foi transferido para os tubos de citometria, colocados previamente em gelo, tendo-se efectuado de seguida uma centrifugação a 950 rpm, durante 5 minutos, a 4°C na centrífuga Centrifuge 5810R. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, colocou-se 600µl de PBS a 4°C e centrifugou-se a 950 rpm, durante 5 minutos, a 4°C na centrífuga acima referida. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. No final, adicionaram-se 600µl de PBS a

4°C e mantiveram-se os tubos em gelo até à realização da leitura no citómetro de fluxo BD FACSCalibur™.

2.5.3 Avaliação da expressão de GFP por microscopia de fluorescência

A eficiência de transfecção dos complexos, preparados com o plasmídeo que codificava a GFP, foi também avaliada por microscopia de fluorescência. Imediatamente antes da incubação dos complexos com as células foi aspirado o meio em que as células se encontravam e colocados 1200µl de meio de cultura DMEM-HG com soro. Foram depois adicionados a cada poço o volume de lipoplexos correspondente a 4µg de ADN. As células foram de seguida incubadas durante quatro horas, a 37°C, numa atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono. Após estas quatro horas, substituí-se o meio contendo os lipoplexos por 3ml de meio de cultura e as células foram colocadas e mantidas na incubadora, mais 48 horas, nas condições de cultura anteriormente referidas. Após as 48 horas de incubação, aspirou-se o meio de cultura e fizeram-se duas lavagens com PBS. Depois adicionaram-se 500µl de paraformaldeído a 4% e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação foram feitas 3 lavagens com PBS e de seguida procedeu-se à montagem das lâminas em meio de montagem Mowiol^R (Sigma Aldrich) [28]. As imagens foram obtidas num microscópio Zeiss Axioskop 2 plus, com a objectiva de 20X, através da camera Zeiss AxioCam HRc.

2.6 Determinação da viabilidade celular

Após as 48 horas de incubação realizadas nos ensaios de transfecção, avaliou-se a viabilidade celular, para as diferentes condições experimentais, utilizando o ensaio de Alamar blue. Este ensaio baseia-se na conversão, pelo ambiente redutor da célula, da resazurina (forma oxidada) em resorufina, a forma reduzida do composto. A resazurina é azul e não é fluorescente, em quanto que a resorufina é vermelha e altamente fluorescente. Deste modo, este ensaio permite medir a capacidade redox das células e

determinar a viabilidade celular no período de cultivo, sem que ocorra o destacamento das células aderentes. Preparou-se meio de cultura DMEM-HG com 10% (v/v) de resazurina (a partir de um “stock” 0,1mg/ml de resazurina) e adicionou-se 300µl desta solução a cada poço. Após a adição dos 300µl, as células foram colocadas na incubadora, a 37°C, até que ocorresse uma mudança de cor de azul para rosa nos poços das células controle, ou seja, nos poços de células que não foram sujeitas a qualquer tipo de tratamento. Depois de ter ocorrido a mudança de cor, parou-se a incubação e foram retirados 170µl do sobrenadante de cada poço, para uma placa de 96 poços, tendo-se lido a absorvância a 570 e 600nm num espectrofotômetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices). A viabilidade celular (em percentagem do controle) foi calculada de acordo com a fórmula $(A570-A600)$ das células tratadas $\times 100 / (A570-A600)$ das células controle [53].

2.7 Análise da ligação e associação celular dos lipoplexos

Para fazer o estudo da ligação e associação celular dos lipoplexos, foram plaqueadas, 24 horas antes do ensaio, 180×10^3 células HepG2 por poço, em placas de 48 poços. Os lipoplexos, compostos por lipossomas com 1 % de rodamina-PE, foram preparados na razão de carga (+/-) 4/1, na ausência ou presença de 20µg de asialofetulina por 1µg de ADN. Após a preparação dos complexos, aspirou-se o meio em que as células se encontravam e colocaram-se 300µl de meio de cultura novo. No caso das condições com galactose, foi adicionado o volume necessário de uma solução “stock” de galactose, aos 300µl de meio de cultura, de modo a obter uma concentração final de 40mg/ml de galactose. Após a adição da galactose, colocaram-se as 2 placas (uma para o ensaio da ligação e outra para o de associação) a incubar a 37°C, durante 30 minutos. Em seguida, uma das placas foi colocada a 4°C (ligação), durante 30 minutos, enquanto a outra continuou a 37°C (associação), por mais 30 minutos. Após estas incubações, foram adicionados os lipoplexos às células, tendo-se, de seguida, efectuado mais uma incubação durante 2 horas e meia, a 4°C e a 37°C, para avaliar, respectivamente, a ligação e a associação celular. As células foram depois lavadas duas vezes com PBS e lisadas com uma solução de 1% Triton X-100 (100µl/poço). A fluorescência foi medida

num fluorímetro SPECTRAmax GEMINI EM (Molecular Devices) utilizando os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 545nm e 587nm, respectivamente [28].

2.9 Avaliação da protecção do ADN conferida pelos complexos

A protecção do ADN conferida pelos complexos foi avaliada através da análise do acesso do brometo de etídio (EtBr) ao material genético. Para isso, prepararam-se lipoplexos contendo 1µg de ADN, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (secção 2.4). De seguida, colocaram-se os lipoplexos correspondentes a 0,5µg de ADN (100µl) numa placa de 96 poços e adicionou-se 100µl de uma solução “stock” de EtBr com uma concentração de 800nM. Esta mistura foi incubada durante 10, tendo depois sido feita a leitura da fluorescência, num fluorímetro SPECTRAmax GEMINI EM (Molecular Devices), utilizando como comprimento de onda de excitação 518nm e de emissão 605nm. O EtBr, uma molécula de pequena dimensão, apresenta uma fluorescência basal que é substancialmente aumentada quando esta sonda se intercala na dupla hélice do ADN. Através deste método podemos então determinar o acesso do EtBr ao ADN dos lipoplexos e, logo, avaliar o grau de exposição/desprotecção do material genético nos complexos. A fluorescência basal do EtBr foi obtida para a condição que envolveu a mistura de 100µl de EtBr (800nM) com 100µl de HBS. A fluorescência máxima foi observada para a condição controlo que envolveu a mistura de 100µl de EtBr (800nM) com 0,5µg de ADN. O valor de fluorescência basal foi subtraído aos valores de fluorescência das amostras, lipoplexos e controlo, tendo-se depois calculado a acessibilidade ao ADN dos lipoplexos em termos de percentagem do controlo (controlo corresponde a 100% de acesso) [53].

2.10 Análise estatística

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

Resultados / Discussão

3.1 Efeito da asialofetuina na actividade biológica dos lipoplexos em células HepG2

A asialofetuina é um ligando específico do receptor ASGP, sendo este receptor especificamente expresso em hepatócitos e encontrando-se sobreexpresso em hepatócitos de hepatocarcinoma, como é o caso das células HepG2. De modo a analisar o efeito da associação de asialofetuina aos lipoplexos na sua capacidade de transfecção, avaliou-se, por luminescência, os níveis de expressão do gene da luciferase em células HepG2, após terem sido sujeitas a transfecção com diferentes formulações de complexos (Figura 10). Os resultados são apresentados em termos de luciferase (RLU)/proteína celular total (mg). Foram preparados lipoplexos compostos por EPOPC:Colesterol/ADN, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, na ausência ou presença de diferentes quantidades de asialofetuina, ou na presença de 32µg de albumina(ASH)/µg de ADN. Os lipoplexos contendo albumina foram considerados como referências, uma vez que a associação de ASH a este tipo de lipoplexos resultou num aumento da expressão do transgene, em diferentes tipos de células, mesmo na presença de soro [29; 31]. Foi também utilizada a lipofectamina como referência, uma vez que, devido aos seus elevados níveis de transfecção, é o reagente de transfecção comercial mais utilizado.

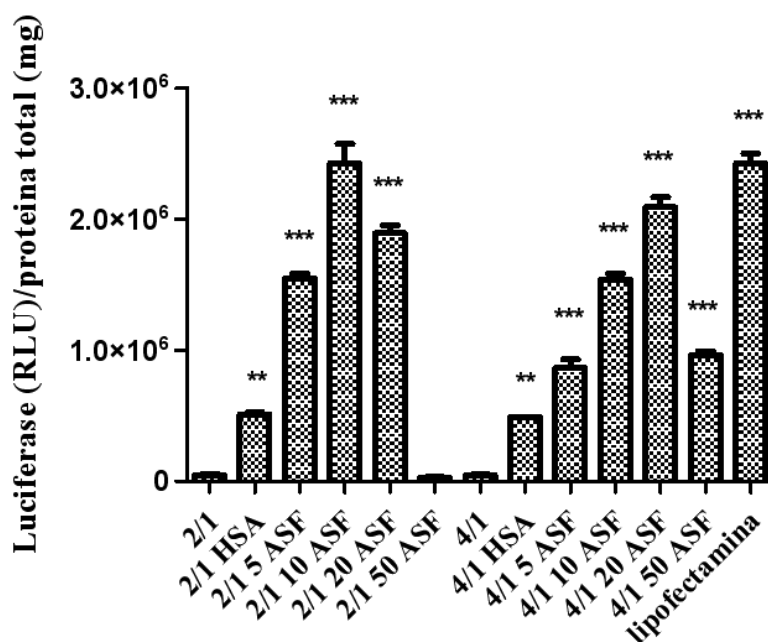


Figura 100 Efeito da associação da asialofetuína a lipoplexos de EPOPC: Colesterol/ADN, na expressão do gene da luciferase na linha celular HepG2. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 5, 10, 20 e 50µg de asialofetuína (ASF)/µg de ADN, ou com 32µg de albumina (ASH)/µg de ADN, e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro. Foi também feita a transfecção com lipofectamina nas mesmas condições experimentais. Os níveis da expressão do gene da luciferase, obtidos 48 horas após a transfecção, são apresentados em termos de luciferase (RLU)/proteína total (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos (** p <0,01; *** p <0,001) correspondem aos valores obtidos com células tratadas com complexos contendo asialofetuína, albumina ou lipofectamina que diferem significativamente dos obtidos com células tratadas com lipoplexos preparados, na mesma razão de carga, mas apenas com os lipossomas EPOPC: Colesterol.

Utilizaram-se 5, 10, 20 e 50µg de asialofetuína por cada µg de ADN de forma a verificar como é que a actividade biológica dos complexos era afectada pela quantidade de asialofetuína. Pela análise da Figura 10 é possível constatar que a associação de 5, 10 e 20µg de asialofetuína aos lipoplexos, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, resultou num aumento significativo da expressão do transgene, tendo-se atingido a potenciação máxima para a quantidade de 10µg de asialofetuína/µg de ADN. A adição de 50µg de asialofetuína (por µg de ADN) aos lipoplexos, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, provocou uma perda total da potenciação da actividade biológica que era encontrada para quantidades inferiores de asialofetuína. Este acontecimento deve-se provavelmente ao facto de a asialofetuína ser uma glicoproteína com carga negativa que, em grandes quantidades (50 µg de asialofetuína/µg de ADN), confere aos lipoplexos, na razão de carga (+/-) 2/1, uma carga excessivamente negativa, dificultando a sua internalização pelas células [44; 45]. No caso dos lipoplexos preparados na razão de carga (+/-) 4/1, a associação de asialofetuína resultou, para todas as quantidades de proteína, numa potenciação significativa da expressão do transgene, tendo-se verificado a potenciação

máxima da transfecção para a quantidade de 20µg asialofetuína/µg de ADN. A existência de um perfil de potenciação da actividade biológica, induzido pela associação de asialofetuína, diferente para as duas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1 dos lipoplexos, pode ser devida ao facto de a presença de asialofetuína acentuar as diferenças de estrutura/propriedades existentes entre os complexos das duas razões de carga. Uma vez que a asialofetuína exhibe carga negativa, uma quantidade de 20µg de asialofetuína/µg de ADN pode tornar a carga superficial dos lipoplexos, preparados na razão de carga (+/-) 2/1, excessivamente negativa, dificultando assim a sua internalização celular devido à existência de repulsões electrostáticas entre a carga negativa dos lipoplexos e a carga negativa da membrana citoplasmática. No caso dos lipoplexos preparados na razão de carga (+/-) 4/1, a quantidade de 20µg de asialofetuína/µg de ADN pode neutralizar parte das cargas positivas dos lipossomas catiónicos sem, no entanto, ser suficiente para tornar negativa a carga superficial dos complexos, não se verificando assim a ocorrência de repulsões electrostáticas entre os complexos e a membrana citoplasmática. Pelos resultados apresentados na Figura 10, podemos verificar que a presença de 10µg de asialofetuína/µg de ADN, no caso dos lipoplexos com uma razão de carga (+/-) 2/1, e de 20µg de asialofetuína/µg de ADN, no caso dos lipoplexos com uma razão de carga (+/-) 4/1, promoveu uma potenciação da actividade biológica dos complexos quatro vezes superior à potenciação induzida pela associação da albumina. Provavelmente, esta potenciação deve-se ao facto de a asialofetuína ser um ligando do receptor ASGP [11; 21; 22], que se encontra sobre expresso em células de hepatocarcinoma como é o caso da linha celular HepG2 [13; 15], facilitando assim a internalização celular dos lipoplexos, contendo asialofetuína, através da endocitose mediada pelo receptor ASGP. No caso da associação de albumina aos lipoplexos, embora ela promova uma potenciação substancial da transfecção, essa potenciação não é devida a um processo de internalização celular específico, mas sim à promoção da endocitose mediada por ligações inespecíficas aos receptores da superfície celular, análogos aos receptores scavenger. Para além disso, sabe-se ainda que a albumina pode facilitar a libertação do ADN da via endocítica, uma vez que a albumina tem sido descrita como sendo capaz de sofrer uma mudança conformacional com uma diminuição do pH, adquirindo propriedades fusogénicas [35; 36].

Pelos resultados apresentados na Figura 10 é também possível constatar que os lipoplexos EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) 2/1, com 10µg de asialofetuína/µg de ADN, bem como os lipoplexos EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) 4/1, com 20µg de asialofetuína/

μg de ADN, possuem uma actividade biológica semelhante à obtida com lipofectamina, que é descrita como sendo o melhor reagente de transfecção que está disponível comercialmente [46].

3.2 Efeito da asialofetuina na actividade biológica dos lipoplexos em células Hela

Com o intuito de verificar se a potenciação da capacidade de transfecção dos complexos induzida pela asialofetuina se deve ao facto de esta proteína ser um ligando do receptor ASGP (que se encontra sobre expresso nas células de HepG2), avaliou-se a actividade biológica dos complexos, com e sem asialofetuína e com albumina, em células Hela, que é uma linha celular que não expressa o receptor ASGP. A actividade biológica dos lipoplexos foi avaliada através da análise dos níveis de expressão do gene da luciferase, tendo os resultados sido apresentados em termos de luciferase (RLU)/proteína celular total (mg) (Figura 11). Também neste ensaio os lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1 contendo albumina foram considerados como controlo positivo, uma vez que apresentam elevada actividade biológica em diversas linhas celulares [29; 31].

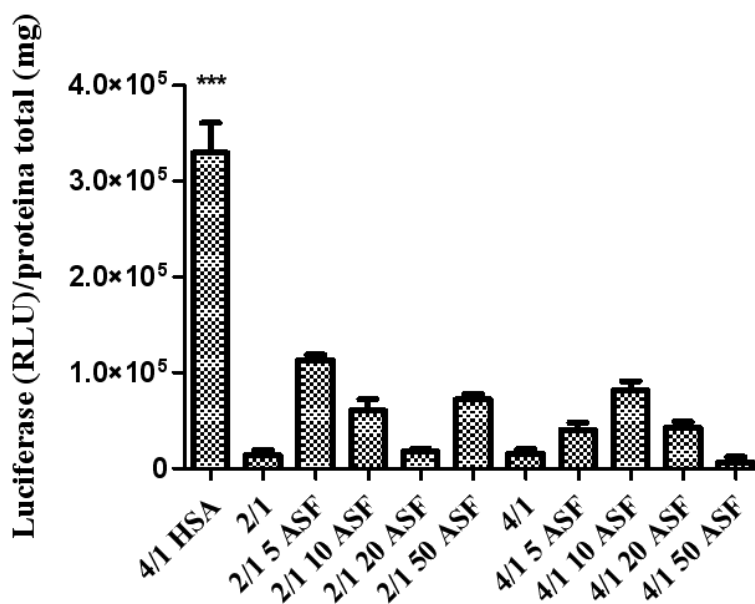


Figura 11 Efeito da associação da asialofetuina a lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN, na expressão do gene da luciferase na linha celular Hela. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 5, 10, 20 e 50 μg de asialofetuina (ASF)/ μg de ADN, ou com 32 μg de albumina (ASH)/ μg de ADN, e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro. Os níveis de expressão do gene da luciferase, obtidos 48 horas após a transfecção, são apresentados em termos de

luciferase (RLU)/proteína total (mg). Os resultados apresentados (média \pm desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos (***) $p < 0,001$ correspondem aos valores obtidos com células tratadas com complexos contendo albumina e diferem significativamente dos obtidos com as células tratadas com todos os outros tipos de lipoplexos.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a potenciação da transfecção induzida pela associação da asialofetuína aos lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN em células Hela, é substancialmente inferior à obtida na linha celular HepG2. É também possível constatar que a transfecção das células Hela (Figura 11) com os lipoplexos preparados com albumina resultou, ao contrário do que foi observado com as células HepG2 (Figura 10), numa expressão do gene da luciferase três vezes superior à registada com os lipoplexos contendo asialofetuína. Estes resultados suportam a hipótese de que os lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN contendo asialofetuína apresentam uma elevada actividade biológica devido, provavelmente, à ligação desta proteína ao receptor ASGP, que desencadeia o processo de endocitose mediado por este receptor, e consequentemente a internalização dos lipoplexos.

A existência de uma modesta potenciação da expressão do gene da luciferase obtida com os lipoplexos de EPOPC:Colesterol/ADN preparados com asialofetuína, relativamente aos lipoplexos simples (sem asialofetuína), deve-se, possivelmente, a interacções inespecíficas dos lipoplexos, preparados com asialofetuína, com componentes da membrana citoplasmática, promovendo assim a sua internalização celular.

3.3 Avaliação da citotoxicidade induzida pelos lipoplexos em células HepG2 e células Hela

Uma das particularidades dos lipoplexos que pode afectar a sua actividade biológica é o facto de a sua aplicação poder resultar em citotoxicidade [30]. Para avaliar se as formulações desenvolvidas apresentavam citotoxicidade, foram feitos estudos de viabilidade celular utilizando o método de Alamar Blue. Este ensaio consiste na conversão, pelo ambiente redutor da célula, da resazunira (forma oxidada) em resorufina (forma reduzida), avaliando assim o estado metabólico da célula [47]. Os resultados obtidos mostram que a viabilidade das células HepG2 (Figura 12A) e das

células Hela (Figura 12B) não foi significativamente afectada pela transfecção realizada com qualquer uma das formulações de lipoplexos testadas.

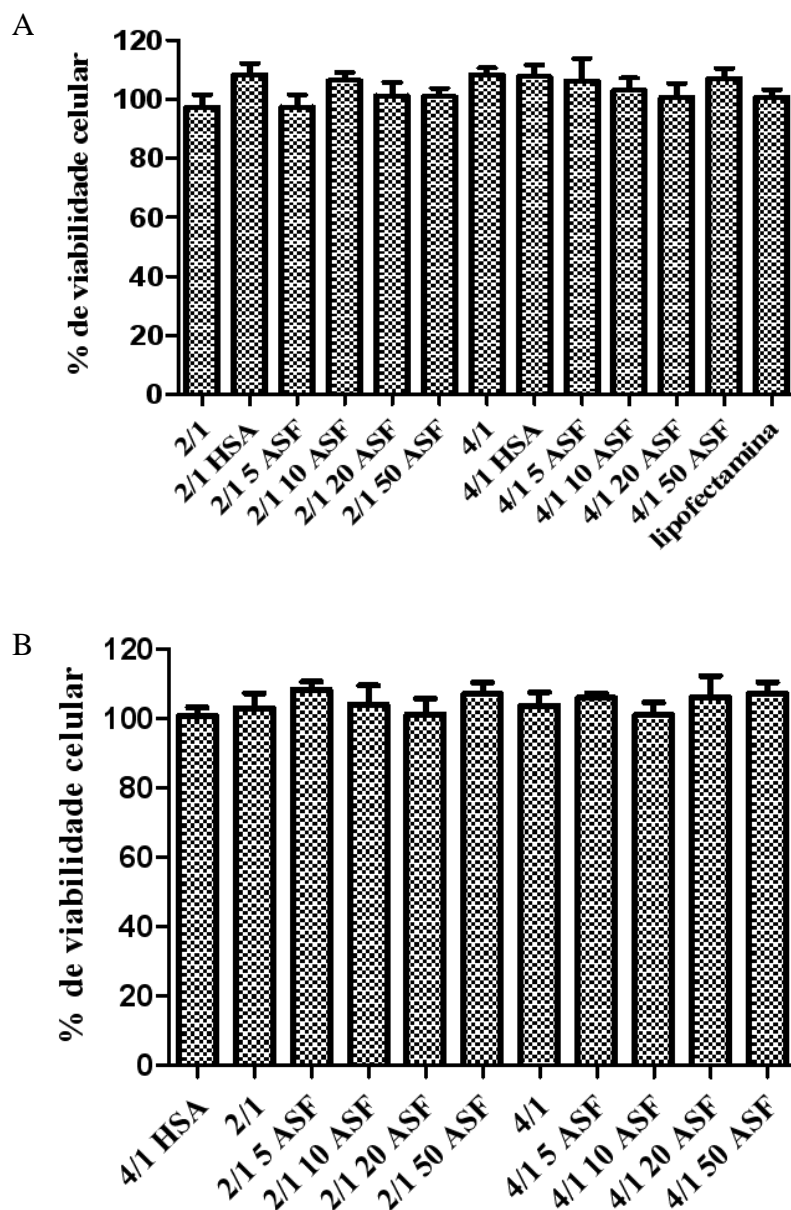


Figura 12 Efeito dos lipoplexos na viabilidade de células HepG2 (A) e células Hela (B). Os valores de viabilidade celular medidos pelo ensaio de Alamar Blue foram expressos em termos de percentagem de viabilidade das células controlo (células sem tratamento). Os resultados apresentados (média \pm desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

3.4 Efeito do soro na actividade biológica dos lipoplexos na linha celular HepG2

Uma das lacunas da utilização de lipossomas catiónicos, como sistemas de transporte e entrega de material genético, é o facto da sua eficiência diminuir drasticamente na presença de soro. Embora em estudos *in vitro* esta limitação possa ser contornada, através da incubação das células com os complexos em meio sem soro, *in vivo*, considerando a administração sistémica, a presença de soro não poderá ser eliminada [29].

Os resultados apresentados anteriormente (Figura 10) mostraram que as melhores formulações de lipoplexos contendo asialofetuína têm uma elevada actividade biológica na presença de soro. Neste ensaio pretendeu-se averiguar se a presença de soro atenua de forma significativa a eficiência dessas formulações de lipoplexos, tendo-se para isso realizado o ensaio de transfecção na presença e ausência de soro.

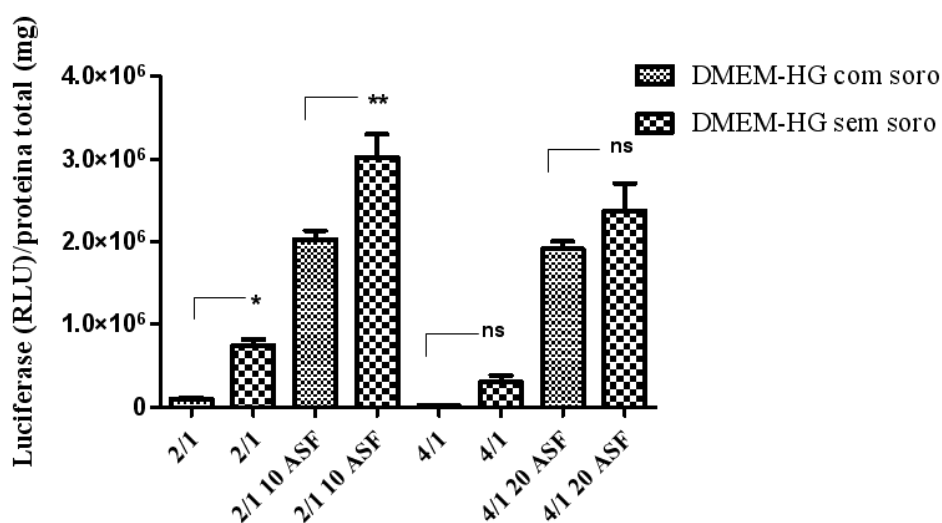


Figura 13 Efeito da presença de soro na capacidade de transfecção dos complexos nas células HepG2. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 10 ou 20µg de asialofetuína (ASF)/µg de ADN e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com ou sem soro. Os níveis de expressão do gene da luciferase, obtidos 48 horas após a transfecção, são apresentados em termos de luciferase (RLU)/proteína total (mg). Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos (*p <0,05; ** p <0,01) correspondem aos valores obtidos com células transfectadas com complexos na ausência de soro que diferem significativamente dos obtidos com células incubadas com os mesmos lipoplexos na presença de soro.

Tal como é possível constatar, pelos resultados apresentados na Figura 13, a presença de soro afecta de forma significativa a actividade biológica dos lipoplexos EPOPC:Coletol/ADN (+/-) 2/1 preparados com ou sem 10µg de asialofetuína/µg de

ADN. Por outro lado, os lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1 contendo ou não 20µg de asialofetuina/µg de ADN, não sofrem uma perda significativa da sua actividade biológica na presença de soro. Este efeito do soro pode dever-se à sua capacidade para induzir a dissociação dos lipoplexos, uma vez que o soro possui proteínas carregadas negativamente que podem interagir com os lipídios catiónicos dos lipoplexos levando à dissociação destes. Contudo, dependendo da estrutura/propriedades dos complexos, pode ocorrer a formação de grandes agregados através da ligação de proteínas do soro aos lipoplexos, diminuído assim a sua eficiência [48; 49]. Por outro lado, a resistência ao soro apresentada pelos lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1, contendo 20µg de asialofetuina/µg de ADN, pode dever-se ao facto deste tipo de lipoplexos apresentarem diferenças estruturais/propriedades, face aos outros complexos, que lhes permitem resistir ao efeito inibitório do soro na transfecção [50; 51].

3.5 Avaliação da percentagem de células HepG2 transfectadas

Com o intuito de analisar o efeito da associação de asialofetuina aos lipoplexos na sua eficiência de transfecção avaliou-se, por citometria de fluxo, a percentagem de células HepG2 transfectadas, após ter sido feita a transfecção com lipoplexos contendo o plasmídeo que codificava a proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 14). Neste estudo, apenas foram avaliadas as melhores formulações de lipoplexos contendo asialofetuina (lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 2/1 com 10µg de asialofetuina/µg de ADN (2/1 10ASF); e lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1 com 20µg de asialofetuina/µg de ADN (4/1 20ASF)) e as formulações controlo (lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 2/1 e 4/1; lipoplexos contendo albumina; e complexos preparados com lipofectamina). A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Um citómetro de fluxo é similar a um microscópio que produz, em vez de imagens da célula, uma quantificação de um conjunto de parâmetros. Desta forma foi possível, utilizando a citometria de fluxo, determinar a quantidade de células que expressavam GFP, após serem transfectadas com diferentes formulações de complexos. Os resultados ilustrados na Figura 15 mostram os histogramas obtidos para as

experiências realizadas com as várias formulações de complexos (traçados a verde). Para calcular a percentagem de células que expressavam GFP fez-se o histograma da subtracção (traçado a vermelho). Este foi obtido por subtracção do histograma das células controlo (traçado a preto), ou seja, células que não sofreram qualquer tipo de transfecção, ao histograma obtido para uma determinada formulação de complexos (traçados a verde). A percentagem de células que expressavam GFP, células que se encontravam no histograma da subtracção (traçado vermelho), foi calculada face ao número total de células existentes no histograma da respectiva experiência (traçado verde).

Pelos resultados apresentados na Figura 14 é possível constatar que a percentagem de células transfectadas que foi obtida com os lipoplexos preparados com asialofetúina, 2/1 10ASF ou 4/1 20ASF, foi muito superior à observada com os lipoplexos simples (sem asialofetúina). Em relação aos complexos preparados com albumina, verificou-se que a percentagem de células transfectada com estes lipoplexos foi idêntica à obtida com os lipoplexos 2/1 10ASF, ou seja, 50% de células transfectadas. Contudo, essa percentagem de células transfectada com os complexos preparados com albumina foi substancialmente inferior aos 70% de células transfectadas observados com os lipoplexos 4/1 20ASF. Do mesmo modo, a percentagem de células transfectadas obtida com lipofetamina (40%) foi muito inferior ($p < 0,001$) à registada com os lipoplexos 4/1 20ASF.

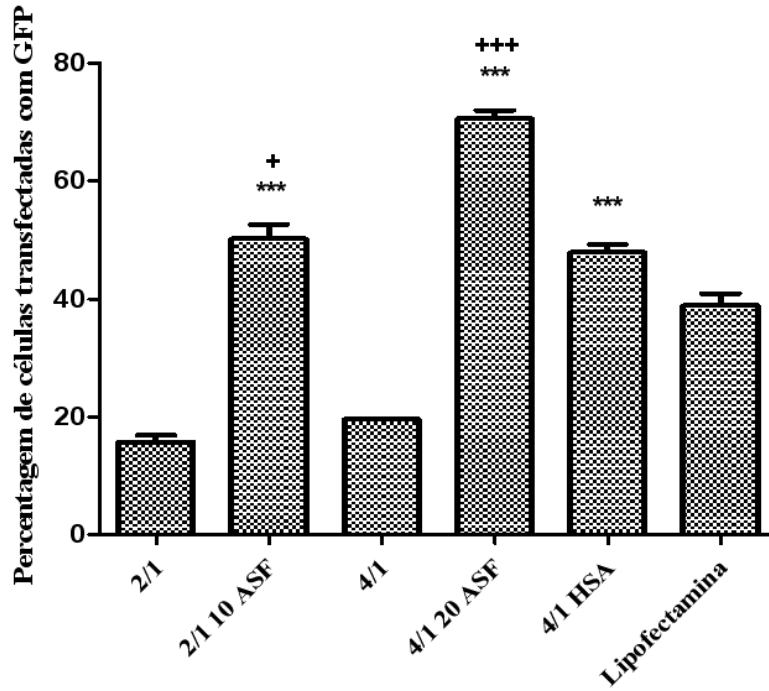
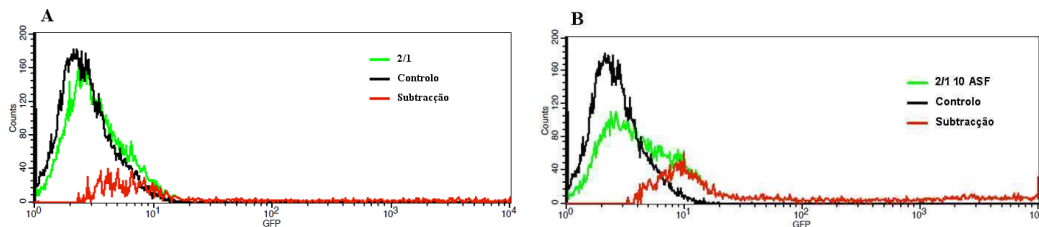


Figura 14 Efeito da associação da asialofetuína a lipoplexos EPOPC: Colesterol/ADN, na percentagem de células HepG2 transfectadas. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 10 e 20µg de asialofetuína (ASF)/µg de ADN, ou com 32µg de albumina (ASH)/µg de ADN, e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro. Foi também feita a transfecção com lipofectamina nas mesmas condições experimentais. A percentagem de células transfectadas (expressam GFP), avaliada 48 horas após a transfecção, é uma média ± desvio padrão de triplicados e é representativa de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos (***) correspondem aos valores obtidos com células tratadas com complexos contendo asialofetuína ou albumina que diferem significativamente dos obtidos com células tratadas com lipoplexos simples (sem asialofetuína e sem albumina) preparados na mesma razão de carga. As cruces (+++p <0,001) correspondem aos valores obtidos com células tratadas com complexos contendo asialofetuína que diferem significativamente dos obtidos com células tratadas com complexos preparados com lipofectamina.

Estes resultados indicam que de todas as formulações testadas os lipoplexos EPOPC: Colesterol/ADN (+/-) 4/1 com 20µg de asialofetuína/µg de ADN (4/1 20ASF) são os que apresentam maior eficiência de transfecção.



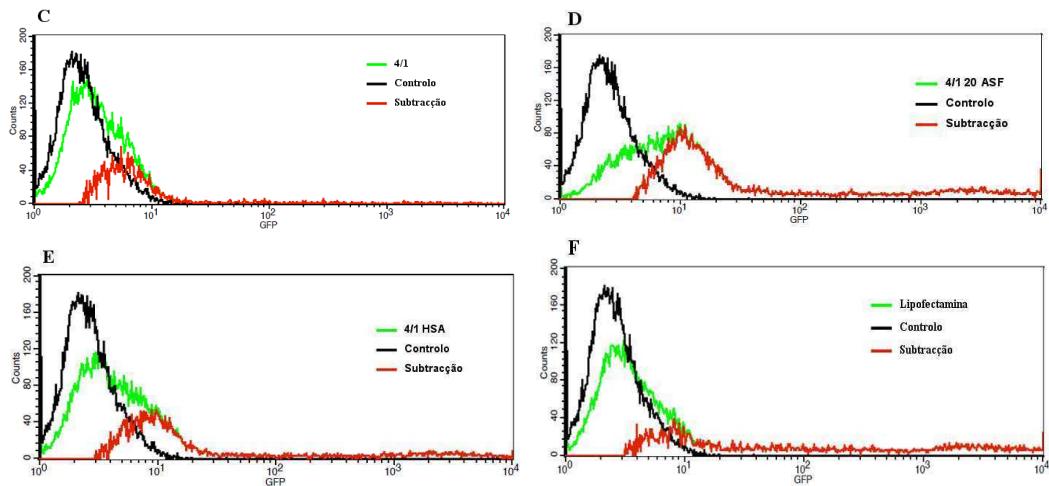


Figura 15 Histogramas obtidos nos ensaios de citometria de fluxo com células HepG2 transfectadas com diferentes formulações. Histogramas obtidos para as experiências realizadas com as várias formulações de complexos (traçados a verde). Histogramas das células que não sofreram transfecção, células controlo (traçado a preto). Histograma resultante da subtração do histograma das células controlo ao histograma das experiências realizadas com cada uma das formulações de complexos (traçado a vermelho). (A) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (2/1); (B) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (2/1) com 10 μ g de asialofetuína/ μ g de ADN; (C) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (4/1); (D) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (4/1) com 20 μ g de asialofetuína/ μ g de ADN; (E) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/1) (4/1) com 32 μ g de albumina/ μ g de ADN; (F) Lipofectamina.

Pela análise dos resultados das Figuras 14 e 15, verifica-se que, embora os lipoplexos preparados com albumina e os lipoplexos 2/1 10ASF apresentem aproximadamente a mesma percentagem de células transfectadas, a expressão de GFP mediada pelos lipoplexos 2/1 10ASF é maior do que a obtida com os lipoplexos preparados com albumina. Na condição experimental que envolveu a transfecção com lipoplexos com 2/1 10ASF observou-se um maior número de células, expressarem uma grande quantidade de GFP, do que a que envolveu a transfecção com complexos preparados com albumina (Figura 15), o que está de acordo com os níveis obtidos na expressão de luciferase (Figura 10). Da mesma forma, se poderá explicar o facto de termos uma expressão de luciferase com a lipofectamina semelhante à obtida com os lipoplexos de 4/1 20ASF (Figura 10), apesar da percentagem de células transfectadas observada com a lipofectamina ser inferior. Assim sendo, verifica-se que os dados obtidos pela citometria de fluxo se encontram de acordo com os resultados obtidos pela luminescência.

3.6 Efeito da associação de asialofetuina aos lipoplexos na transfecção de células HepG2

Com o objectivo de analisar o efeito da asialofetuina na capacidade de transfecção dos lipoplexos e na tentativa de correlacionar com os resultados obtidos por citometria de fluxo e luminescência, avaliou-se a actividade biológica dos complexos, preparados com o plasmídeo que codificava a GFP, por microscopia de fluorescência em células HepG2 (Figura 16). Foram avaliados apenas os lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF e os respectivos lipoplexos simples (preparados na mesma razão de carga (+/-) e sem asialofetuina). Pela análise da Figura 16 é possível constatar que tanto com os lipoplexos 2/1 10ASF como com os lipoplexos 4/1 20ASF, obteve-se um maior número de células transfectadas, células que expressavam GFP, do que com os lipoplexos, com a mesma razão de carga (+/-), sem asialofetuina. Também neste ensaio foi notório que a utilização de lipoplexos 4/1 20ASF resulta num maior número de células transfectadas do que a utilização de lipoplexos 2/1 10ASF, o que está de acordo com os resultados registados no ensaio de citometria de fluxo (Figura 14).

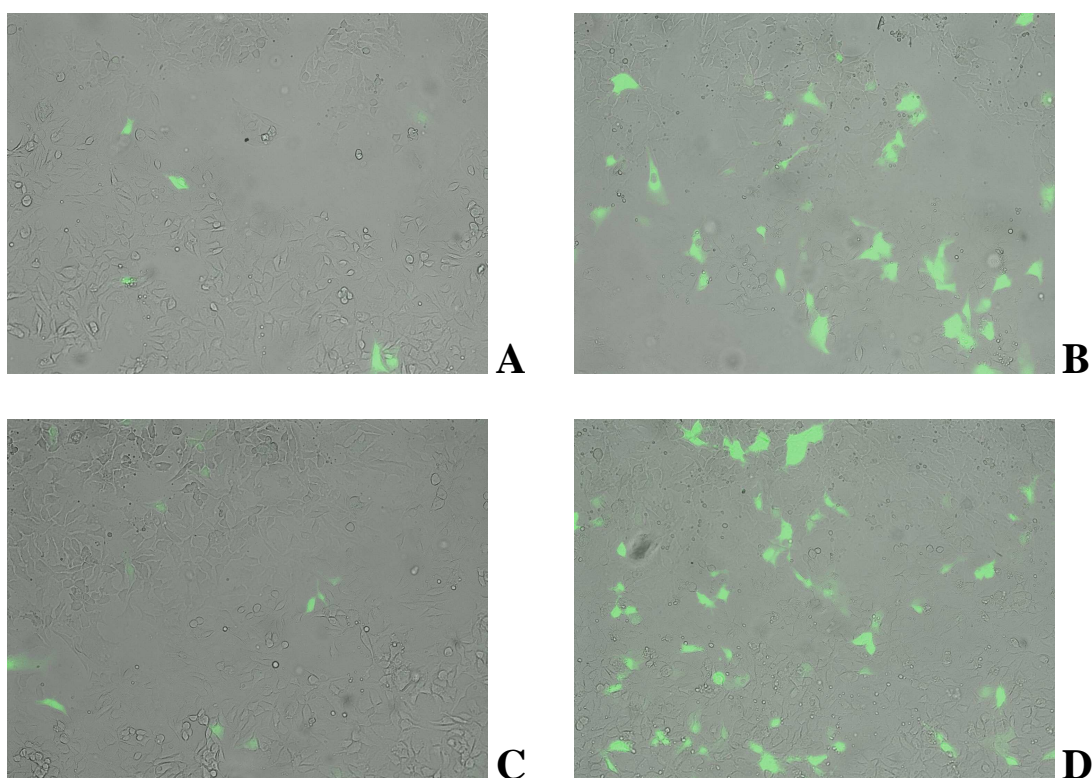


Figura 16 Efeito da asialofetuina na capacidade de transfecção dos lipoplexos EPOPC:Coolesterol/ADN em células HepG2. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 10 e 20 μ g de asialofetuina (ASF)/ μ g de ADN, e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro. As células transfectadas (expressam GFP) foram analisadas 48 horas após a transfecção por microscopia de fluorescência (com ampliação de 20X). Este ensaio é representativo de dois ensaios independentes. (A) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (2/1); (B) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (2/1) com

10µg de asialofetuína/µg de ADN; (C) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (4/1); (D) EPOPC:Coolesterol/ADN (+/-) (4/1) com 20µg de asialofetuína/µg de ADN.

Estes resultados, em conjunto com os obtidos nos ensaios de luminescência (para ambas as linhas celulares) e citometria de fluxo, parecem apoiar a hipótese de que os lipoplexos preparados com asialofetuína interagem com os receptores ASGP, presentes na linha celular HepG2, desencadeando um processo de endocitose mediada por este receptor [52], resultando, conseqüentemente, numa maior actividade biológica.

3.7 Protecção do ADN associado aos lipoplexos

De modo a avaliar a capacidade dos lipoplexos para condensarem e protegerem o ADN transportado, foi realizado um ensaio com brometo de etídio. O brometo de etídio é uma pequena molécula fluorescente que ao intercalar nos ácidos nucleicos emite uma fluorescência intensa. Através deste método podemos determinar a acessibilidade ao ADN dos lipoplexos. Os resultados ilustrados na Figura 17 mostram que para os lipoplexos simples (sem asialofetuína) houve uma diminuição da fluorescência do brometo de etídio (menor acesso do brometo de etídio ao ADN) com o aumento da razão de carga (+/-) dos lipoplexos, indicando que o aumento da quantidade de lipossomas catiónicos induz um maior grau de condensação e protecção do ADN [53]. Esta relação, entre o acesso do brometo de etídio e a razão de carga (+/-) dos lipoplexos, não foi verificada para os lipoplexos preparados com asialofetuína, tendo-se, no entanto, observado uma diminuição significativa ($p < 0,001$) do acesso do brometo de etídio ao ADN destes lipoplexos face aos lipoplexos simples (sem asialofetuína), preparados na mesma razão de carga (+/-).

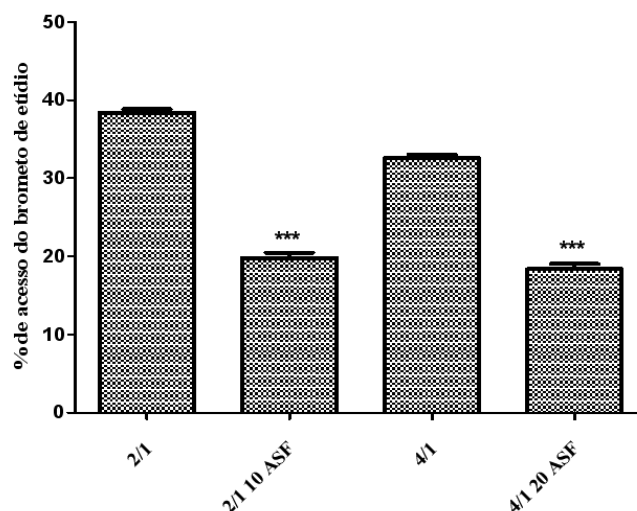


Figura 17 Efeito da asialofetuína na acessibilidade do brometo de etídio ao ADN dos complexos. Os resultados (média \pm desvio padrão de triplicados) são apresentados em percentagem do controlo (ADN na ausência de lípido) e são representativos de três experiências independentes. Os asteriscos (***) correspondem aos valores obtidos com os lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF que diferem significativamente dos obtidos com lipoplexos simples (sem asialofetuína), com a mesma razão de carga.

Possivelmente a presença de asialofetuína nos complexos promove uma maior compactação e protecção do ADN, através da formação de lipoplexos mais estáveis ou mesmo através da alteração da estrutura dos lipoplexos permitindo uma melhor compactação/protecção do ADN. Usando como termos de comparação os lipoplexos preparados com albumina, que tal como a asialofetuína é uma proteína negativa, seria de esperar que a associação da asialofetuína aos lipoplexos, tal como foi verificado com albumina, aumentasse ligeiramente o acesso do brometo de etídio ao seu ADN [29]. Contudo, com a associação da asialofetuína aos lipoplexos verificou-se o efeito contrário, muito provavelmente devido ao facto da asialofetuína ser uma proteína de muito menor tamanho que a albumina, podendo, conseqüentemente, promover a formação de lipoplexos com maior grau de compactação/protecção do ADN.

3.8 Efeito da presença da galactose na actividade biológica dos lipoplexos contendo asialofetuína em células HepG2

O receptor ASGP liga especificamente resíduos de galactose e N-acetilgalactosamina existentes nos terminais de glicoproteínas sem resíduos de ácido siálico. Para além

disso, vários estudos têm demonstrado que a afinidade da ligação ligando/receptor é altamente dependente do número de galactoses, da sua distância e do arranjo tridimensional dos açúcares [11; 13]. A asialofetúina é conhecida como um excelente ligando do receptor ASGP, sendo selectivamente reconhecida por este receptor. Esta proteína possui três cadeias de hidratos de carbono que têm no seu terminal resíduos de Nacetilgalactosamina [22]. Na tentativa de verificar se a potenciação da actividade biológica dos lipoplexos, promovida pela associação da asialofetúina (que se observou na linha celular HepG2), se deve à ligação das galactoses da asialofetúina ao receptor ASGP, permitindo assim uma maior internalização dos lipoplexos, avaliou-se o efeito de elevadas concentrações de galactose livre na actividade biológica dos lipoplexos contendo asialofetúina. Para isso, foram adicionadas as quantidades de 4, 10, 20 e 40 mg de galactose/ml ao meio, 30 minutos antes do início da transfecção, tendo-se mantido a galactose durante as 4 horas em que as células foram incubadas com os lipoplexos. Avaliou-se então o efeito da galactose na actividade biológica das melhores formulações de lipoplexos contendo asialofetúina, ou seja, os lipoplexos EPOPC:Coletol/ADN (+/-) 2/1 com 10µg de asialofetúina/µg de ADN (2/1 10ASF) e EPOPC:Coletol/ADN (+/-) 4/1 com 20µg de asialofetúina/µg de ADN (4/1 20ASF) (Figura 18).

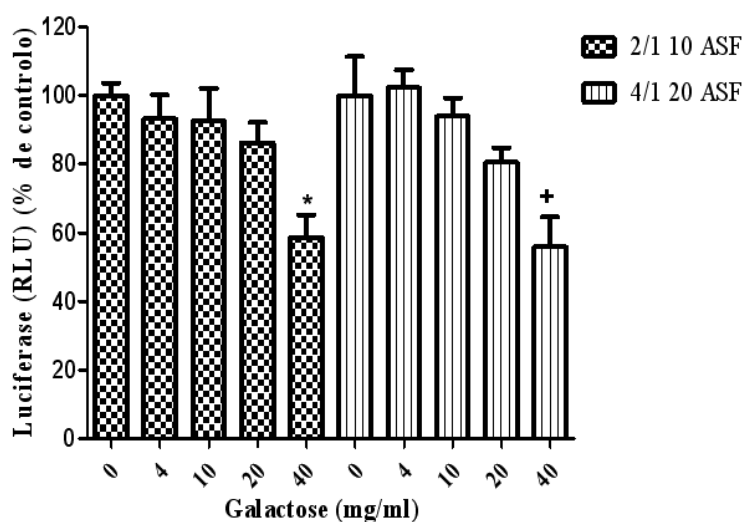


Figura 18 Efeito da galactose na actividade biológica dos lipoplexos contendo asialofetúina em células HepG2. Os níveis de expressão do gene da luciferase são apresentados em percentagem do controlo (média \pm desvio padrão de triplicados), correspondendo o controlo a células transfectadas com as mesmas formulações na ausência de galactose, e são representativos de três experiências independentes. Os asteriscos (* $p < 0,05$) correspondem aos valores obtidos com células transfectadas com lipoplexos na presença de galactose, que diferem significativamente dos obtidos com células tratadas com os mesmos lipoplexos, na ausência de galactose.

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que a presença de 40mg de galactose/ml resulta numa inibição de cerca de 40% da actividade biológica das duas formulações (2/1 10ASF e 4/1 20ASF). Esta inibição deve-se, possivelmente, à competição da galactose livre com a asialofetuina dos lipoplexos pelo receptor ASGP, fazendo com que ocorra uma menor ligação da asialofetuina a este receptor, promovendo assim uma menor internalização dos lipoplexos e, conseqüentemente, diminuindo a expressão do transgene. A elevada concentração de galactose necessária para induzir a inibição da actividade biológica pode, possivelmente, dever-se ao facto dos resíduos de galactose individuais exibirem menor afinidade para o receptor ASGP do que os resíduos agrupados numa mesma molécula. Um único resíduo de galactose apresenta uma constante de dissociação da ordem de 10^{-3} M, enquanto três resíduos de galactose na mesma molécula, que é o caso da asialofetuina, tem uma constante de dissociação da ordem dos 5×10^{-9} M [13]. Para além disso, a interacção de múltiplas moléculas de asialofetuina dos lipoplexos com receptor pode dificultar ainda mais a competição da galactose pelo receptor.

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que, para qualquer uma das quantidades de galactose utilizadas, a viabilidade celular não foi afectada, mostrando que a redução da actividade biológica dos lipoplexos, na presença de 40mg de galactose/ml, não se deve a alterações da viabilidade celular.

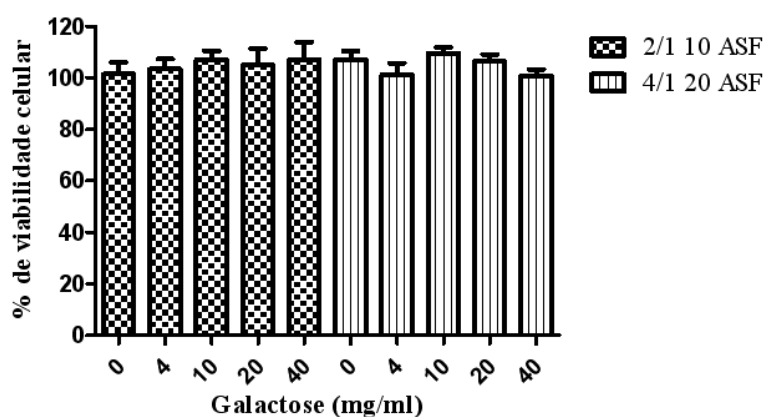


Figura 19 Efeito da presença da galactose e dos lipoplexos na viabilidade de células HepG2. Os valores de viabilidade celular medidos pelo ensaio de Alamar Blue foram expressos em termos de percentagem de viabilidade das células controlo (células sem tratamento). Os resultados apresentados (média \pm desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

Para verificar se a inibição da actividade biológica dos lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF, na presença de 40mg de galactose/ml, se devia à competição da galactose livre

com a asialofetuina dos lipoplexos pela ligação ao receptor ASGP, foi avaliado o efeito da mesma quantidade de galactose na actividade biológica dos lipoplexos simples (produzidos nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1) e dos preparados com albumina, na linha celular HepG2. Os resultados ilustrados na Figura 20 mostram que a presença de 40mg de galactose/ml não teve qualquer efeito na actividade biológica dos lipoplexos simples (preparados nas razões de carga 2/1 e 4/1) nem na dos lipoplexos compostos por albumina. A possível explicação para que as formulações de lipoplexos sem asialofetuina não sofram inibição da actividade biológica na presença de galactose, deve-se, provavelmente, ao facto deste tipo de lipoplexos não interagirem com o receptor ASGP, e desta forma a presença de galactose não perturba nem a sua ligação nem a sua internalização, ou seja, não afecta a sua actividade biológica. Os lipoplexos contendo albumina são internalizados através da ligação inespecífica aos receptores da superfície celular, análogos aos receptores scavenger, que promovem a sua endocitose [35; 36]. Por outro lado, os lipoplexos simples interagem com os proteoglicanos sulfatados, componentes celulares altamente negativos presentes na superfície das células, sendo deste modo internalizados [30]. Estes resultados sugerem, assim, que a inibição da actividade biológica dos lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF, induzida pela presença de 40 mg de galactose/ml, se deve ao facto da galactose competir pela ligação ao receptor ASGP, levando a que ocorra uma menor ligação da asialofetuina dos lipoplexos ao receptor, o que por sua vez promove uma menor internalização dos lipoplexos e, consequentemente, uma menor transfecção.

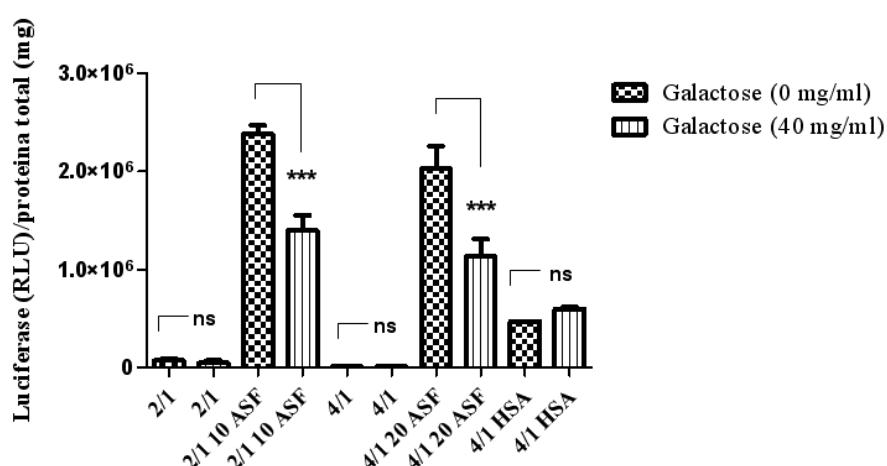


Figura 20 Efeito da presença da galactose na actividade biológica dos lipoplexos em células HepG2. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 10 e 20µg de asialofetuina (ASF)/µg de ADN, ou com 32µg de albumina (ASH)/µg de ADN, e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro contendo ou não 40mg de galactose/ml. Os níveis de expressão do gene da luciferase, obtidos 48 horas após a transfecção, são apresentados em termos de. Os resultados apresentados (média ± desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios

independentes. Os asteriscos (***) correspondem aos valores obtidos com células transfectadas com lipoplexos, na presença de 40mg de galactose/ml, que diferem significativamente dos obtidos com células transfectadas com os mesmos lipoplexos, mas na ausência de galactose.

Pelos resultados apresentados na Figura 21, verifica-se que a presença de 40mg de galactose/ml, durante a transfecção com as várias formulações de lipoplexos, não afectou de forma significativa a viabilidade celular. Isto significa que as alterações da actividade biológica dos lipoplexos observadas na presença de galactose não se devem a alterações de viabilidade celular.

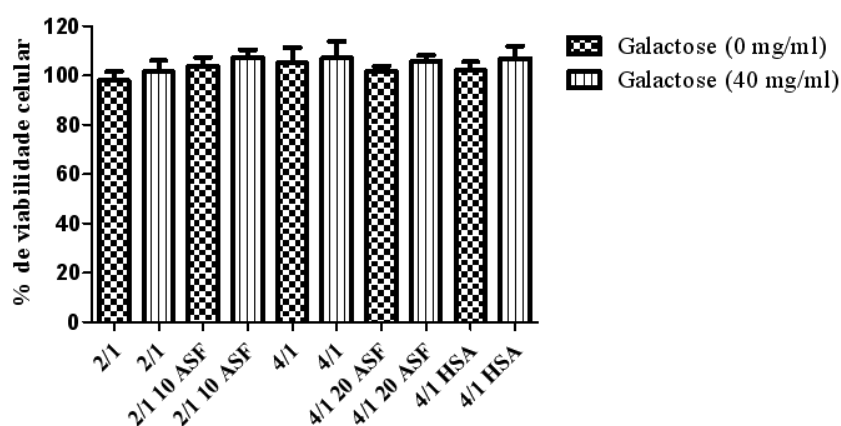


Figura 21 Efeito da presença da galactose e dos lipoplexos na viabilidade de células HepG2. Os valores de viabilidade celular medidos pelo ensaio de Alamar Blue foram expressos em termos de percentagem de viabilidade das células controlo (células sem tratamento). Os resultados apresentados (média \pm desvio padrão de triplicados) são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

3.9 Efeito da presença de galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas pelos lipoplexos

Ainda com o objectivo de esclarecer do efeito da galactose livre na actividade biológica dos lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF, avaliou-se, por citometria de fluxo, o efeito da presença da galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas com lipoplexos preparados com o plasmídeo que codificava a GFP. Pela análise do gráfico da Figura 22 é possível constatar que a presença de galactose diminuiu de forma significativa ($p < 0,01$) a percentagem de células transfectadas, quando a transfecção foi realizada com os lipoplexos 2/1 10ASF e 4/1 20ASF. Para os lipoplexos com a mesma razão de carga (+/-), mas sem asialofetulina, não se verificou nenhuma diferença significativa entre a percentagem de células transfectadas na presença ou na ausência de galactose. Estes

resultados devem-se, possivelmente, ao facto da internalização dos lipoplexos sem asialofetuina não ser mediada pelo receptor ASGP, mas sim pelos proteoglicanos existentes na superfície celular, não sofrendo, deste modo, qualquer alteração com a presença da galactose [30].

Estes resultados também constituem um indício de que a galactose livre compete com a asialofetuina dos lipoplexos (2/1 10ASF e 4/1 20ASF) pela ligação ao receptor ASGP, fazendo com que ocorra, provavelmente, uma menor internalização dos lipoplexos e, logo, uma menor percentagem de células transfectadas.

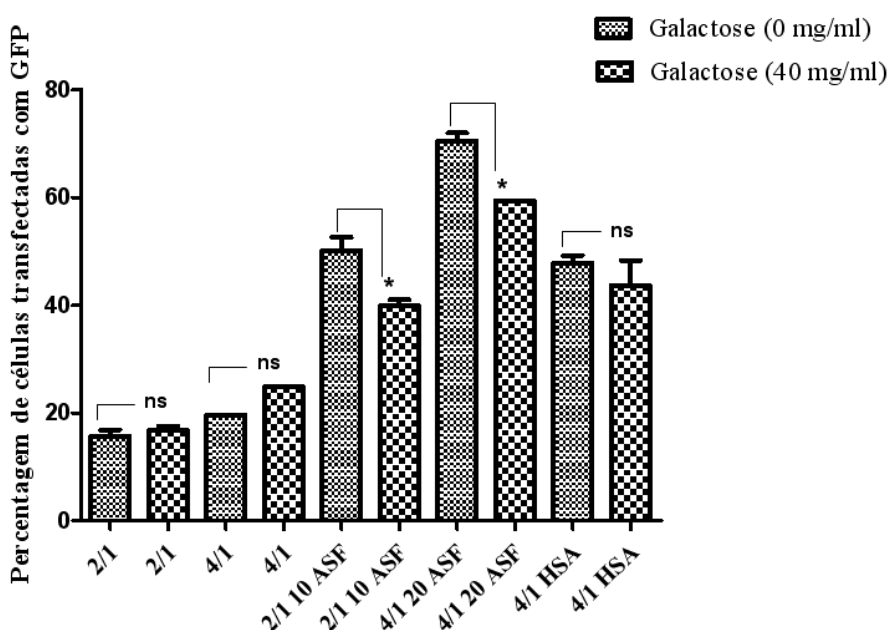


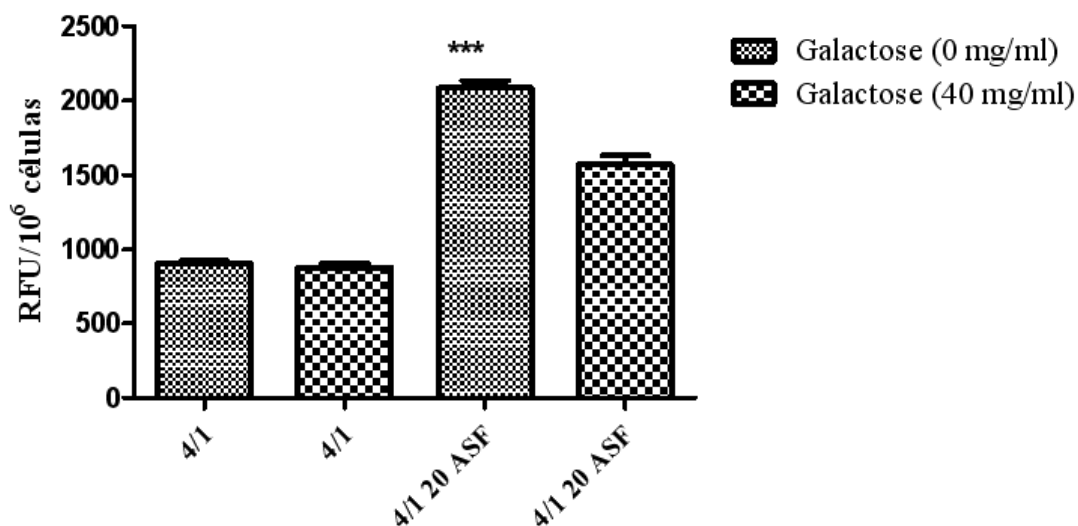
Figura 22 Efeito da presença da galactose na percentagem de células HepG2 transfectadas. Os complexos foram preparados, nas razões de carga (+/-) 2/1 e 4/1, com ou sem 10 e 20µg de asialofetuina (ASF)/µg de ADN e incubados com as células, durante 4 horas, em meio de cultura com soro contendo ou não 40mg de galactose/ml. A percentagem de células transfectadas (expressam GFP), avaliada 48 horas após a transfecção, é uma média ± desvio padrão de triplicados e é representativa de pelo menos dois ensaios independentes. Os asteriscos (** p <0,01) correspondem aos valores obtidos com células transfectadas com lipoplexos, na presença de 40mg de galactose/ml, que diferem significativamente dos obtidos com células transfectadas com os mesmos lipoplexos, mas na ausência de galactose.

3.10 Efeito da asialofetuina na ligação e associação celular dos lipoplexos nas células HepG2

Para investigar se a potenciação da actividade biológica dos lipoplexos, induzida pela associação da asialofetuina, envolvia o aumento da ligação e internalização celular dos

complexos, avaliaram-se estes dois parâmetros, em células HepG2, utilizando lipoplexos preparados com lipossomas marcados com 1% de rodamina-PE.

A



B

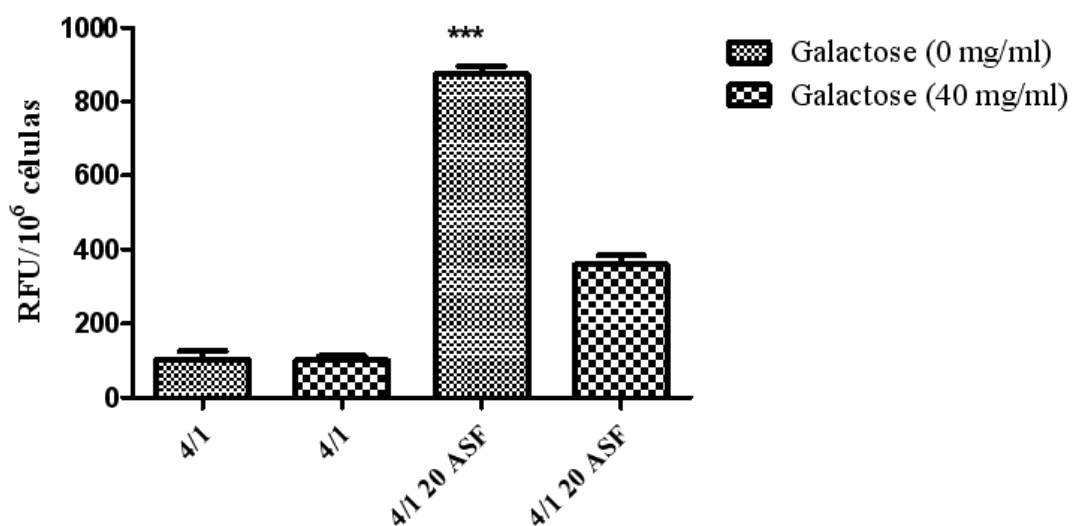


Figura 23 Efeito da associação de asialofetuína e da presença de galactose na extensão de ligação (A) e associação celular (B) dos lipoplexos em células HepG2. Os lipoplexos, preparados com lipossomas marcados com 1% de rodamina-PE, foram produzidos na razão de carga (+/-) 4/1, contendo ou não asialofetuína. As células foram incubadas com os lipoplexos, na presença ou ausência de galactose, a 4°C (ligação) ou a 37°C (associação celular). Os resultados foram expressos em RFU/10⁶ células (média ± desvio padrão de triplicados) e são representativos de pelo menos três ensaios independentes. Os asteriscos (***) correspondem aos valores obtidos com células transfectadas com lipoplexos preparados com asialofetuína, que diferem significativamente dos obtidos com as células tratadas com os lipoplexos simples.

As células foram incubadas com os lipoplexos a 4°C, para avaliar a ligação dos lipoplexos, uma vez que a esta temperatura não ocorre endocitose, e a 37°C, para avaliar a associação celular, já que a esta temperatura ocorrem os dois processos, ligação e internalização celular. Tal como se pode constatar pelos resultados apresentados na Figura 23, a associação da asialofetúina aos lipoplexos resultou num aumento substancial da extensão da ligação e da associação celular dos complexos. Este aumento, face aos valores registados com os lipoplexos simples, deve-se, possivelmente, à ligação da asialofetúina dos lipoplexos ao receptor ASGP, presente nas células HepG2, promovendo assim uma maior ligação e internalização dos complexos [21; 52]. No que diz respeito ao efeito da galactose, observou-se que a presença desta molécula não teve qualquer efeito nos níveis de ligação e internalização celular dos lipoplexos simples, enquanto nos lipoplexos preparados com asialofetúina (4/1 20ASF) provocou uma redução manifesta quer da ligação quer da associação celular (Figura 23). Estes resultados mostram, de acordo com o esperado, que a galactose livre compete com a asialofetúina dos lipoplexos (4/1 20ASF) pela ligação ao receptor ASGP, reduzindo, conseqüentemente, a ligação e a internalização destes lipoplexos. Contrariamente ao esperado, observaram-se, para ambas as formulações de complexos, valores de ligação superiores aos valores de associação celular. Uma possível explicação para estes resultados reside no facto da constante de dissociação ser maior à medida que aumenta a temperatura, ou seja, a fracção dos lipoplexos que se dissocia tende a aumentar face a fracção que permanece associada. Assim, a 37°C a probabilidade de ocorrer dissociação entre os lipoplexos e a célula é maior do que a 4°C. Este facto pode, pelo menos parcialmente, justificar a obtenção de uma maior ligação do que associação celular. Por outro lado, o processo de endocitose, na linha celular HepG2, pode ser um processo com uma cinética lenta, o que, muito provavelmente, contribuiria em grande parte para este resultado inesperado [54].

Conclusão

Embora o hepatocarcinoma seja um tumor altamente maligno, sendo o terceiro tipo de cancro que causa maior mortalidade a nível mundial, o fígado é um órgão que possui uma vasta gama de características que o tornam bastante atraente para a terapia genica. Uma das suas características mais atractivas é o facto de no fígado ser expresso especificamente e abundantemente o receptor asialoglicoproteína na superfície dos hepatócitos. Para além disto, este receptor encontra-se ainda sobreexpresso em hepatócitos cancerígenos. Embora tenha sido feita uma vasta pesquisa na busca de um vector, que torne a entrega do material genético eficiente e específico para as células cancerígenas do fígado, ainda existe um vasto caminho a percorrer para alcançar uma estratégia adequada. Os estudos realizados nos últimos anos em torno da utilização de complexos lipossoma catiónico/ADN, para transporte de material genético, resultaram num progresso assinalável destes sistemas. Este trabalho consistiu portanto no desenvolvimento de um sistema de base lipídica associado a um ligando para o receptor ASGP que apresentasse uma elevada capacidade de transfecção, que fosse estável nos fluidos biológicos e que tornasse o transporte e entrega de material genético específico para as células de hepatocarcinoma. As diferentes formulações de complexos (diferentes razões de carga (+/-) e distintas quantidades de asialofetuina) foram submetidas a ensaios de actividade biológica, a estudos dos mecanismos responsáveis pela actividade biológica, bem como a análise de protecção do material genético, que permitiram tirar conclusões cruciais, tais como:

A associação da asialofetuina aos lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN resulta, geralmente, numa potenciação significativa da expressão do transgene bem como da percentagem de células transfectadas, dependendo a extensão desta potenciação da razão de carga (+/-) e da quantidade de asialofetuina associada. A maior potenciação induzida pela asialofetuina foi verificada para os lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1, com 20µg de asialofetuina/ µg de ADN (4/1 20ASF) na linha celular HepG2. A potenciação exibida pelas formulações com asialofetuina foi manifestamente reduzida na linha celular Hela.

Algumas das formulações de complexos de lipossomas catiónicos/ADN produzidas demonstraram uma diminuição significativa da sua actividade biológica na presença de soro. Porém as formulações de lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1, com e sem 20µg de asialofetuína/ µg de ADN (4/1 20ASF) apresentam resistência ao efeito inibitório do soro.

O aumento da razão de carga (+/-) nos lipoplexos de EPOPC:Colesterol/ADN simples promove um aumento da compactação e protecção do ADN. A associação da asialofetuína aos lipoplexos anula o efeito do aumento da razão de carga (+/-) dos lipoplexos, embora a presença da asialofetuína resulte num aumento da compactação e protecção do ADN.

A adição da galactose ao meio de transfecção dos lipoplexos de EPOPC:Colesterol/ADN revestidos de asialofetuína resulta na diminuição significativa da expressão do transgene bem como da percentagem de células transfectadas da linha celular HepG2.

A presença da asialofetuína nomeadamente nos lipoplexos EPOPC:Colesterol/ADN (+/-) 4/1, com 20µg de asialofetuína/ µg de ADN origina um aumento substancial da extensão da ligação e da associação celular, na linha celular HepG2. A adição da galactose livre leva a redução manifesta quer da ligação quer da associação celular dos lipoplexos provocada pela presença da asialofetuína.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que estes lipoplexos, preparados com lipossomas catiónicos de EPOPC:Colesterol e asialofetuína, constituem um novo sistema de transporte e entrega de material genético que poderá ser de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais contra o hepatocarcinoma.

Bibliografia

- [1] Parkin DM. Cancer Incidence in five continents. IARC scientific publications volume VIII [No. 155]. 2002. Lyon: IARCPress.
- [2] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76.
- [3] Yu MW, Chen CJ. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:790–794.
- [4] Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323–331.
- [5] Garner RC, Miller EC, Miller JA. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res* 1972;32:2058–2066.
- [6] El Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;126:460–468.
- [7] Maheshwari S, Sarraj A, Kramer J, El-Serag HB. Oral contraception and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):506-13.
- [8] Talamini R, Polesel J, Montella M, et al. Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in Italy. *Int J Cancer* 2006;119:2916–2921.
- [9] Duffy, J. P., J. R. Hiatt, and R. W. Busuttill. 2008. Surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer J*. 14: 100-110.

- [10] Ishizaki, Y. and S. Kawasaki. 2008. The evolution of liver transplantation for hepatocellular carcinoma (past, present, and future). *J. Gastroenterol.* 43: 18-26.
- [11] Wu J et al. 1998. Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficacy by labeling with asialofetuin in rodents. *Hepatology.* 27: 772–778.
- [12] Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 2009 Sep;31(3):399-409.
- [13] I. Geffen, M. Spiess. 1992. Asialoglycoprotein receptor. *137B*: 181-219.
- [14] Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005 Dec;272(24):6179-217.
- [15] D. Trerè, L. Fiume, L. Badiali De Giorgi, G. Di Stefano, M. Migaldi and M. Derenzini. 1999. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells. *Br J Cancer.* 81(3):404-8.
- [16] Weigel PH, Yik JH. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2-3):341-63.
- [17] Chiacchia KB, Drickamer K. Direct evidence for the transmembrane orientation of the hepatic glycoprotein receptors. *J Biol Chem.* 1984 Dec 25;259(24):15440-6.
- [18] Yik JH, Saxena A, Weigel PH. The minor subunit splice variants, H2b and H2c, of the human asialoglycoprotein receptor are present with the major subunit H1 in different hetero-oligomeric receptor complexes. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):23076-83.
- [19] Hardy MR, Townsend RR, Parkhurst SM, Lee YC. Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry.* 1985 Jan 1;24(1):22-8.

- [20] Stockert RJ, Kressner MS, Collins JC, Sternlieb I, Morell AG. IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Oct;79(20):6229-31.
- [21] Bider MD, Spiess M. Ligand-induced endocytosis of the asialoglycoprotein receptor: evidence for heterogeneity in subunit oligomerization. *FEBS Lett*. 1998 Aug 28;434(1-2):37-41.
- [22] Wu J et al. Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficacy by labeling with asialofetuin in rodents. *Hepatology* 1998; 27: 772–778.
- [23] Bilder MC, Cescato R, Neno P, Spiess M. High-affinity ligand to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2. *Eur J Biochem* 1995;230:207-212.
- [24] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med*. 2007 Oct;9(10):833-42.
- [25] O'Brien JA, Holt M, Whiteside G, Lummis SC, Hastings MH. Modifications to the hand-held Gene Gun: improvements for in vitro biolistic transfection of organotypic neuronal tissue. *J Neurosci Methods*. 2001 Nov 15;112(1):57-64.
- [26] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982;1(7):841-5.
- [27] Cristiano RJ, Xu B, Nguyen D, Schumacher G, Kataoka M, Spitz FR, Roth JA. Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer Detect Prev*. 1998;22(5):445-54.
- [28] Faneca H, Faustino A, Pedroso de Lima MC. Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes. *J Control Release*. 2008 Mar 3;126(2):175-84.

- [29] Faneca H, Simões S, Pedroso de Lima MC. Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum. *J Gene Med.* 2004 Jun;6(6):681-92.
- [30] Simões S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, Düzgünes N, de Lima MP. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005 Mar;2(2):237-54.
- [31] H. Faneca, A.S. Cabrita, S. Simões, M.C. Pedroso de Lima, Evaluation of the antitumoral effect mediated by IL-12 and HSV-tk genes when delivered by a novel lipid-based system, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1093–1102.
- [32] Wrobel I, Collins D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta.* 1995 May 4;1235(2):296-304.
- [33] Conner SD, Schmid SL Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.
- [34] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004 Jan 1;377(Pt 1):159-69.
- [35] K.K. Sorensen, J. Melkko, B. Smedsrod, Scavenger-receptor-mediated endocytosis in endocardial endothelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*, *J. Exp. Biol.* 201 (1998) 1707–1718.
- [36] R. Nunes, C.L. Kiang, D. Sorrentino, P.D. Berk, “Albumin-receptor” uptake kinetics do not require an intact lobular architecture and are not specific for albumin, *J. Hepatol.* 7 (1988) 293–304.
- [37] Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11854-9.

- [38] Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, Russell DW, Miller AD. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1426-31.
- [39] Arangoa MA, Düzgüneş N, Tros de Ilarduya C. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes. *Gene Ther*. 2003 Jan;10(1):5-14.
- [40] Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4455–4459.
- [41] Suzuki T et al. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett* 1998; 425: 436–440.
- [42] Wagner E et al. Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/ DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6099–6103.
- [43] Fehér J, Lengyel G. [Hepatocellular carcinoma: occurrence, risk factors, biomarkers]. *Orv Hetil*. 2010 Jun 6;151(23):933-40.
- [44] Barthel F, Remy JS, Loeffler JP, Behr JP. Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol* 1993; 12:553–560.
- [45] Templeton NS et al. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 647–652.
- [46] Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol*. 2011 Jun 10;12:27.

- [47] K. Konopka, E. Pretzer, P.L. Felgner, N. Düzgünes, Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1312 (1996) 186–196.
- [48] Li S, Tseng WC, Stolz DB, et al. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther* 1999; 6: 585–594.
- [49] Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998; 5: 930–937.
- [50] Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, et al. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368: 276–288.
- [51] Serikawa T, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K, Kitagawa T. A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467: 419–430.
- [52] Simões S et al. Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene Ther* 1999; 6: 1798–1807.
- [53] Duarte S, Faneca H, de Lima MC. Non-covalent association of folate to lipoplexes: a promising strategy to improve gene delivery in the presence of serum. *J Control Release*. 2011 Feb 10;149(3):264-72.
- [54] Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Koiwai K, Emi N, Kono K. Effect of transferrin as a ligand of pH-sensitive fusogenic liposome-lipoplex hybrid complexes. *Bioconjug Chem*. 2008 Aug;19(8):1588-95.