

Integrando *expertises* para criação de uma plataforma para testes de drogas de ácido nucléico utilizando lipossomos e embriões de galinha

Palavras-Chave: LIPOSSOMAS, EMBRIÃO, GALINHA, ÁCIDO NUCLEICO

Autores(as):

ANA CAROLINA ELOY MARCIO, FCF – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. ENEIDA DE PAULA (orientadora), IB – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. LÚCIA ELVIRA ALVARES (coorientadora), IB – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

Os fármacos de ácidos nucleicos são uma classe inovadora de medicamentos que utilizam moléculas de DNA ou RNA para a terapêutica, apesar de apresentarem baixa estabilidade e biodisponibilidade, dada a rápida degradação dos ácidos nucleicos no sangue, e da falta de direcionamento do *delivery* terapêutico, que afeta a resposta imune e promove toxicidade (Li et al., 2019). Uma estratégia para carrear fármacos nos sistemas biológicos são os lipossomos, vesículas formadas por bicamadas lipídicas bastante semelhantes às das células humanas. Um dos exemplos de lipossomos comerciais disponíveis é a Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), composto pelos lipídios 2,3-diioleyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium (DOSPA) e 1,2-di-(octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) na proporção 3:1 (PubChem) e amplamente utilizado para os ensaios de transfecção.

O uso de embriões de galinha como modelo de estudo em diversas áreas da biologia é bastante consolidado, dada a similaridade com organismos amniotos, incluindo o homem, baixo custo, a caracterização de todo o seu desenvolvimento (Hamburger & Hamilton, 1951), rapidez dos ensaios e facilidade de acesso aos embriões para realização de experimentos. Um exemplo destes é a eletroporação, técnica utilizada para a transfecção de um ou mais genes, com a passagem de corrente e uma diferença de potencial, em determinada estrutura em desenvolvimento. A eletroporação, ainda que ofereça resultados bastante claros, apresenta alta taxa de mortalidade e de malformações, aumentando, conseqüentemente, o número de animais utilizados para a obtenção de resultados estatisticamente significativos. Dessa forma, novas metodologias necessitam serem estudadas e empregadas para viabilizar esse quadro.

2. METODOLOGIA:

2.1. Produção do plasmídeo pCMV-eGFP e síntese dos lipossomas

Para a produção do plasmídeo pCMV-eGFP, utilizado como vetor de expressão para o gene *Green Fluorescent Protein* (GFP) e como controle de nossos experimentos, realizou-se o protocolo de transformação de bactérias competentes DH5- λ com o kit *Plasmid Plus Maxi-Prep* (Qiagen). Os lipossomas foram preparados através do método de hidratação do filme seco (Nascimento Vieira et al., 2019), no qual um filme lipídico na parede de um tubo *Falcon* é formado através do processo de secagem com nitrogênio gasoso, há adição de água e agitação em vórtex, para a formação das vesículas. Após esse procedimento, realizou-se o método de extrusão (Vakili-Ghartavol et al., 2020), que consiste na filtração da suspensão lipossomal por várias vezes, para moldá-los de acordo com o tamanho desejado. Neste projeto, foram utilizados dois tipos de lipídeos: o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) e a 1,2-di-(octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), na proporção molar de 1:3 (Kim et al., 2015), e filtros de 100 nm.

2.2. Manipulação e injeção do vetor e dos lipossomas em embriões de galinha

Foram mensuradas as taxas de transfecção do vetor pCMV-eGFP com Lipofectamina 2000 25% (v/v) (Grupo Controle) e dos Lipossomas sintetizados nas concentrações de 25% e 12,5% (v/v) (Grupos Experimentais). A concentração de DNA em ambos os casos foi fixada em 200 ng/ μ L (Takase; Takashi, 2019). Nos embriões de galinha, foram analisados os sistemas cardiovascular, músculo-esquelético e nervoso.

Para o sistema cardiovascular, a injeção foi feita na veia cardinal caudal, no estágio HH14-HH15 (Hamburger & Hamilton, 1951), com 50-55 horas de incubação, tempo coincidente com o fechamento do âmnio. A agulha de microinjeção foi introduzida imediatamente abaixo da abertura remanescente do âmnio, externa aos somitos (Imagem 1a). Para os sistema músculo-esquelético e nervoso, a injeção foi feita no celoma intra-embriônico (Imagem 2b) e no tubo neural (Imagem 2c). Inicialmente, o projeto objetivava transfectar também os olhos (Imagem 1d), porém, dada a complexidade, a estrutura não foi incluída na análise.

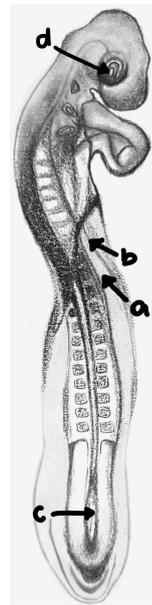


Imagem 1 - Representação de embrião no estágio HH15 indicando os principais locais de injeção: veia cardinal caudal (a), botão do membro (b), tubo neural (c) e olho (d).

Após a injeção, os ovos foram vedados com fita adesiva porosa, para as trocas gasosas entre o embrião e o ambiente, e devolvidos à chocadeira até o estágio HH17-HH18 (aproximadamente 3 dias), para a coleta dos embriões. O estágio HH17-HH18 foi escolhido para as análises devido ao crescimento e proliferação das células transfectadas, resultando no pico de expressão do plasmídeo pCMV-eGFP. Para visualização da expressão, os ovos foram colocados na lupa, sob luz ultravioleta.

2.3. Hibridização *in situ*

Para a confirmação dos resultados vistos macroscopicamente, foi realizada a hibridização *in situ*. Essa técnica consiste na síntese de uma sonda de RNA antisense marcada com um fluoróforo, que se anela a regiões específicas em que localiza-se o gene de interesse. Neste projeto, a sonda de RNA antisense foi sintetizada a partir de produtos de PCR de um vetor contendo o cDNA do gene que codifica a proteína GFP. O fragmento da PCR foi purificado (Sigma-Aldrich) e transcrito com a enzima SP6 RNA polimerase. O RNA antisense resultante desta etapa foi marcado com digoxigenina-11-UTP utilizando o kit *RNA DIG labeling mix* (Roche). A sonda foi purificada com o kit *Illustra* (GE Healthcare, Brasil), quantificada no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e diluída (1 μ g/ μ L) em solução de hibridação NTMT (0,1M NaCl, 0,1M Tris-HCl, 0,05 MgCl₂ e 1% Tween 20) a 70°C.

Os embriões inteiros (*whole-mount*) foram hibridizados de acordo com protocolo pré-estabelecido (Alvares et al., 2009). O sinal foi visualizado com o substrato NBT/BCIP (Promega, EUA). Para a clarificação dos embriões, foram realizados banhos com concentrações crescentes de metanol (25, 50, 75 e 100%,v/v) e, posteriormente, de glicerol (50 e 80%, v/v). Posteriormente, os embriões foram incluídos em blocos de gelatina, cortados no vibrátomo (Leica) na espessura de 40 um e colocados em lâminas. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas utilizando-se um estereomicroscópio (Leica).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Transfecção com Lipofectamina 2000

Uma análise da Lipofectamina 2000 através do equipamento de rastreamento de partículas (NTA) e *software NanoSight*, para identificação do tamanho das partículas lipídicas, evidenciou homogeneidade em sua composição, com lipossomas de 100 a 200 nm (Gráfico 1).

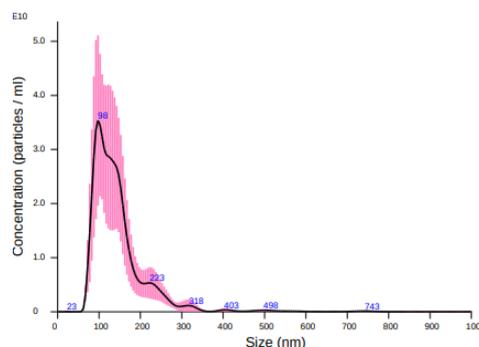


Gráfico 1 - Análise dos tamanhos das partículas da lipofectamina 2000. Diluição 1000x.

Os embriões injetados com o complexo Lipofectamina 2000/pCMV-eGFP apresentaram taxa de sobrevivência superior a 85% nos três sistemas biológicos: O *delivery* do vetor pCMV-eGFP ocorreu de forma exitosa no sistema cardiovascular (63%) (Imagem 2), especialmente na camada do miocárdio (Imagem 2C), mas não nos brotos do membro e tubo neural. Essas regiões não foram incluídas para as análises de transfecção com lipossomas. O número de embriões malformados foi baixo, sendo 11% daqueles injetados no sistema cardiovascular e 14% injetados nos botões do membro e tubo neural. Dentre as malformações no sistema cardiovascular provocadas pela manipulação elevada, destaca-se a acentuada hipertrofia vascular, hemorragias

Tabela 1 - Parâmetros avaliados nos experimentos para *delivery* com lipofectamina 2000 em diferentes tecidos/órgãos do embrião de galinha. À esquerda n, à direita %. Somente foram contabilizados os experimentos em que nenhum fator externo, como viabilidade da lipofectamina ou dos plasmídeos, interferiram nos resultados.

	Sistema Cardiovascular		Limb Bud		Tubo Neural	
Adquiridos	84	-	12	-	12	-
Injetados	54	64,29%	7	58,33%	7	58,33%
Sobrevivência	53	98,15%	6	85,71%	6	85,71%
Malformação	6	11,11%	1	14,29%	1	14,29%
Taxa de Delivery	34	62,96%	0	0%	0	0%

Gráfico 2 - Resumo dos resultados obtidos com a lipofectamina 2000 25% da solução. Em vermelho para o sistema cardiovascular, amarelo para os botões em desenvolvimento e azul para o tubo neural.

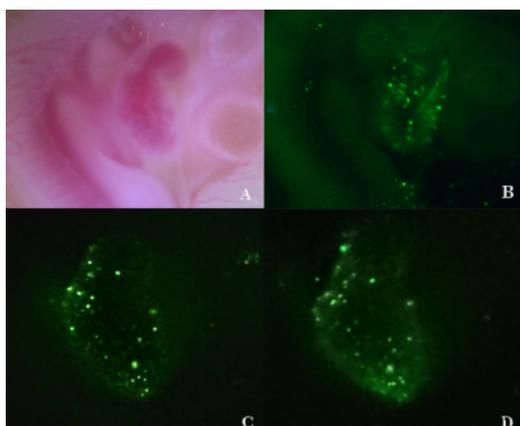
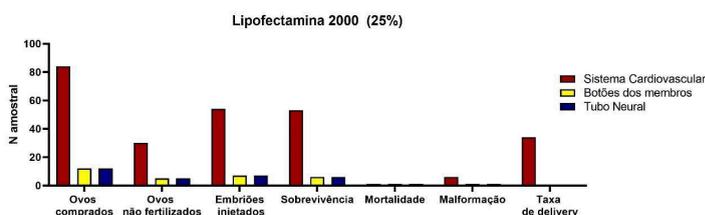


Imagem 2 - Imagens representativas dos resultados de *delivery* com lipofectamina 2000 no coração de embriões de galinha. A luz ultravioleta permite a visualização do gene repórter GFP. À esquerda, imagem em campo claro (A) e à direita, escuro (fluorescência; B), para comparação. Note o coração em diástole (C) e, à direita (D), em sístole. Quando se contrai, o coração fica praticamente todo esverdeado (D), pois as fibras internas se aproximam, criando uma região de expressão densa.

e torções no eixo de formação do embrião (Tabela 1, Gráfico 2).

Os motivos para as diferenças no *delivery* entre as diferentes estruturas/órgãos do embrião permanecem por serem estabelecidos. É possível que na fase embrionária escolhida para a injeção, o coração tenha um maior número de células proliferativas aptas a internalizar o DNA? Com relação aos membros, na fase em que foram injetados, eles são formados por uma “capa” de ectoderma, preenchida por células mesenquimais derivadas da placa mesodérmica lateral. Os tecidos mesenquimais são difíceis de serem transfectados (receber *delivery* de DNA) por outras metodologias, como a eletroporação. No tubo neural, a ausência de expressão pode ser explicada pela abertura parcial do neuróporo posterior, o que permitiria um extravasamento parcial de DNA.

3.2. Transfecção com Lipossomos

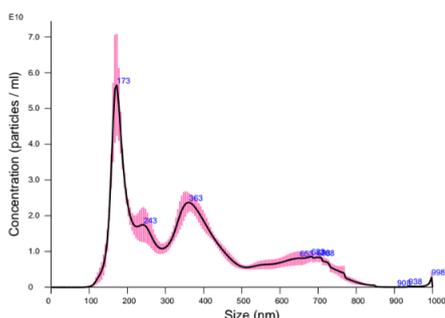


Gráfico 3 - Análise dos tamanhos das partículas do lipossoma preparado. Diluição 1000x.

Os lipossomos sintetizados na composição DOTAP:DOPE 1:3 foram analisados através do equipamento NTA e *software NanoSight* e apresentaram heterogeneidade em sua composição (mais de uma população de partículas), com tamanhos entre 100-800 nm (Gráfico 3).

Após a injeção, na veia cardinal, dos lipossomos nas concentrações de 25% e 12,5%, observou-se baixa sobrevivência dos embriões para ambas (17% para a concentração de 25% e 37,5% para a concentração de 12,5%) e alta porcentagem de malformações (92% e 100%, respectivamente) (Tabela 2, Gráfico 4). Não foi observada transfecção no coração, evidenciando o baixo poder de *delivery* desses carreadores e sua alta toxicidade para os embriões de galinha.

Como perspectiva do presente trabalho, será realizado o testes de citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações de lipossomos DOTAP:DOPE 1:3 (ensaio de MTT), a fim de verificar a maior concentração não citotóxica para retomar os estudos *in vivo* do *delivery* de ácidos nucléicos.

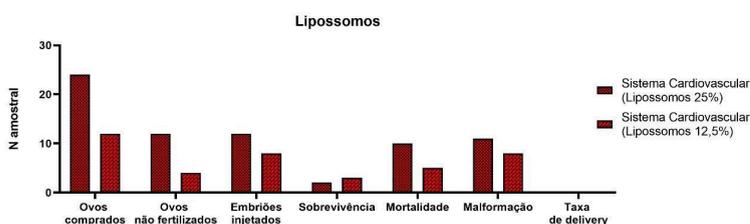


Gráfico 4 - Resumo dos resultados obtidos com os lipossomos sintetizados para o sistema cardiovascular. Em vermelho escuro para a concentração 25% da solução, em vermelho claro para a concentração 12,5% da solução.

	Lipossoma 25% solução		Lipossoma 12,5% solução	
Adquiridos	24	-	12	-
Injetados	12	50%	8	66,67%
Sobrevivência	2	16,67%	3	37,50%
Malformação	11	91,67%	8	100%
Taxa de Delivery	0	0%	0	0%

Tabela 2 - Parâmetros avaliados nos experimentos para *delivery* com lipossomos DOTAP:DOPE 1:3 em diferentes tecidos/órgãos do embrião de galinha. À esquerda n, à direita %. Somente foram contabilizados os experimentos em que nenhum fator externo, como viabilidade da lipofectamina ou dos plasmídeos, interferiram nos resultados.

CONCLUSÕES:

A transfecção carregada por Lipofectamina 2000, na concentração de 25%, foi eficaz no sistema cardiovascular, mas não nos brotos dos membros e no tubo neural. A concentração de 25% e 12,5% para os lipossomos foi escolhida por ser 25% a concentração de Lipofectamina 2000 utilizada para a transfecção e que apresentou sucesso. Entretanto, o presente estudo mostrou que lipossomos, nessas concentrações, foram

tóxicos para os embriões de galinha. O ensaio de viabilidade/citotoxicidade celular (MTT) será realizado *in vitro* para averiguar a concentração ideal e não citotóxica dos lipossomos, para que os ensaios *in vivo* com estes carreadores sejam retomados.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvares, Lúcia Elvira, et al. "Chicken Dapper Genes Are Versatile Markers for Mesodermal Tissues, Embryonic Muscle Stem Cells, Neural Crest Cells, and Neurogenic Placodes." *Developmental Dynamics*, vol. 238, no. 5, May 2009, pp. 1166–1178, <https://doi.org/10.1002/dvdy.21950>.
2. Balazs, Daniel A., and WT. Godbey. "Liposomes for Use in Gene delivery." *Journal of Drug delivery*, vol. 2011, 2010, pp. 1–12, www.hindawi.com/journals/jdd/2011/326497/, <https://doi.org/10.1155/2011/326497>.
3. Hamburger, Viktor, and Howard L. Hamilton. "A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo." *Journal of Morphology*, vol. 88, no. 1, Jan. 1951, pp. 49–92, <https://doi.org/10.1002/jmor.1050880104>.
4. Kim, Bieong-Kil, et al. "DOTAP/DOPE Ratio and Cell Type Determine Transfection Efficiency with DOTAP-Liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1848, no. 10, Oct. 2015, pp. 1996–2001, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.020>.
5. Li, Mingyuan, et al. "Composition Design and Medical Application of Liposomes." *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 164, Feb. 2019, pp. 640–653, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>.
6. Nascimento Vieira, Ana Laís, et al. "Anaesthetic Benefits of a Ternary Drug Delivery System (Ropivacaine-In-Cyclodextrin-In-Liposomes): In-Vitro and In-Vivo Evaluation." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 72, no. 3, 20 Dec. 2019, pp. 396–408, <https://doi.org/10.1111/jphp.13211>.
7. PubChem. "Lipofectamine." [Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/100984821](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/100984821).
8. Takase, Yuta, and Yoshiko Takahashi. "Blood Flow-Mediated Gene Transfer and SiRNA-Knockdown in the Developing Vasculature in a Spatio-Temporally Controlled Manner in Chicken Embryos." *Developmental Biology*, vol. 456, no. 1, 1 Dec. 2019, pp. 8–16, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160618304809?via%3Dihub, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.08.001>
9. Vakili-Ghartavol, Roghayyeh, et al. "Optimization of Docetaxel Loading Conditions in Liposomes: Proposing Potential Products for Metastatic Breast Carcinoma Chemotherapy." *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 27 Mar. 2020, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62501-1>.