

COMPLEXOS CATIÓNICOS LIPOSSOMA-DNA, UM VEÍCULO NÃO VIRAL ALTERNATIVO PARA TERAPIA GENÉTICA EM TECIDO ÓSSEO

Maria Pia Ferraz

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
mpferraz@ufp.pt

Andreia Cabral

Investigadora
Instituto de Engenharia Biomédica - INEB

RESUMO

O desenvolvimento de vectores continua a ser um dos grandes problemas em terapia genética. Os diversos tipos de vectores são utilizados com o objectivo de transportar o DNA terapêutico ao núcleo das células-alvo, sendo os mais utilizados os vectores virais, dado a sua eficiência na libertação intracelular do material genético. No entanto, os lipossomas catiónicos, sendo vectores não virais, podem constituir um bom método para a libertação de genes em células do tecido ósseo, dado a sua versatilidade e segurança.

ABSTRACT

The development of vectors is one of the biggest challenges in genetic therapy. The different types of vectors are used with the goal of transporting therapeutic DNA to the target cells nucleus. Viral vectors are the most used due to their efficiency on intracellular release of genetic material. However, cationic liposomes can also be effective for delivering genes to bone tissue cells mainly due to their versatility and safety

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERAPIA GENÉTICA: TIPOS DE VECTORES UTILIZADOS

A terapia genética consiste na introdução de material genético no interior da célula, para que o produto da sua expressão possa curar ou retardar a progressão de uma determinada doença. Mais de 2000 pacientes em todo o mundo já foram submetidos a tratamentos com terapia genética desde 1990, utilizando para o transporte de genes, vectores virais e não virais (Kikuchi e Suzuki *et al.*, 1999). Os diversos tipos de vectores são utilizados com o objectivo de levar o DNA terapêutico ao núcleo das células-alvo. Uma questão-chave da terapia genética é a escolha do vector adequado a cada situação. Um vector ideal seria aquele que pudesse acomodar um tamanho ilimitado de DNA, fosse disponível numa forma concentrada, pudesse ser facilmente produzido, ser direccionado para tipos específicos de células, não permitisse replicação autónoma do DNA, garantisse uma expressão genética a longo prazo e fosse não-tóxico e não-imunogênico. Tal vector ainda não existe e nenhum dos sistemas de entrega de DNA actualmente disponíveis para transferência genética *in vivo* é perfeito com respeito a qualquer um desses pontos.

Os vectores virais, usados na maior parte dos casos, incluem retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e lentivírus. Possuem características que permitem uma eficiente transferência de material genético, tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, apresentam algumas limitações: presença de resposta imunitária contra o sistema de transfecção, limitação no tamanho do plasmídeo a incorporar, possibilidade de recombinação e dificuldade na sua produção em grande escala (Kikuchi e Suzuki *et al.*, 1999). Por sua vez, os vectores não virais, apesar de não possuírem essas limitações, têm uma baixa eficiência e expressão transiente, apesar de em alguns casos esta expressão transiente poder ser usada no tratamento de doenças crónicas ou agudas, por administrações repetidas (Tseng e Huang, 1998). Entre os vectores não virais, os lipossomas são os mais utilizados. Apresentam como vantagens a simplicidade de preparação e segurança de utilização em seres humanos, podendo transportar diferentes tipos de material genético (Tseng e Huang, 1998). A sua superfície é facilmente modificável com açúcares ou compostos hidrofílicos a fim de alcançar células ou tecidos específicos, tendo, mesmo assim, um menor custo de produção que os vectores virais (Kikuchi e Suzuki *et al.*, 1999).

2. CARACTERÍSTICAS DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas nas quais um pequeno volume aquoso é encapsulado numa bicamada lipídica. O tamanho destas vesículas varia entre um mínimo teórico de 25 nm de diâmetro até vários micrómetros (Monkkonen e Urtti, 1998). Os lipossomas têm propriedades únicas que os tornam sistemas de incorporação e transporte apropriados tanto para substâncias solúveis em água, como em solventes orgânicos: as substâncias hidrófilas são incorporadas no espaço interno aquoso dos lipossomas e as hidrófobas na bicamada lipídica. Com pequenas excepções, pode dizer-se que é possível incorporar em lipossomas praticamente qualquer tipo de substância, independen-

te do seu peso molecular, carga eléctrica e solubilidade (Lima e Mota, 2003). Tendo em conta o seu tamanho, os lipossomas podem ser considerados vesículas pequenas (50-80 nm), grandes (80-1000nm) ou gigantes (1-50µm). São ainda definidos de acordo com o número de bicamadas lipídicas ou "lamelas" em unilamelares, oligolamelares (2-10 bicamadas), e multilamelares (Lasic e Templeton, 1996).

Baseado no tamanho e número de bicamadas lipídicas e tamanho, os lipossomas são classificados em SUV ("small unilamellar vesicles"), LUV ("large unilamellar vesicles"), OLV ("oligolamellar vesicles"), MLV ("multilamellar vesicles") e MVL ("multivesicular liposomes") (Santos e Castanho, 2002).

3. NATUREZA DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

Os lipossomas catiónicos são constituídos principalmente, por misturas binárias entre um lípido catiónico e um composto neutro (co-lípido). Os lípidos catiónicos são compostos por uma extremidade catiónica (iões ternários ou quaternários de amónia, guanidina, etc.), um "linker" e uma parte hidrofóbica (Tranchant e Thompson *et al.*, 2004). Nos últimos anos têm sido levados a cabo muitos trabalhos para o desenvolvimento de novos lípidos catiónicos com menor toxicidade e diferente capacidade para mediar a entrega de genes (Fig. 1). Trabalhos desenvolvidos no início dos anos 90 mostraram que a natureza do lípido catiónico, isto é, comprimento e saturação das cadeias de ácidos gordos, natureza das ligações químicas entre as várias partes da molécula, o comprimento do espaço entre a parte com carga e a parte hidrofóbica, natureza da carga e valores de pK, densidade de cargas e número de cargas por molécula,

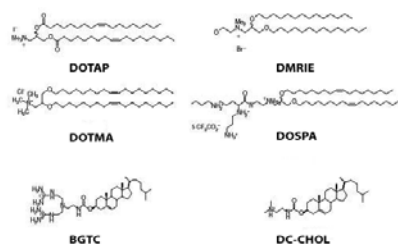


FIGURA 1 Estrutura de alguns lípidos catiónicos utilizados em terapia génica. A importância da associação de um co-lípido para o aumento da capacidade dos lipossomas catiónicos transfectarem as células, têm sido demonstrada em vários trabalhos (Zuidam e Barenholz, 1998; Cruz e Simões *et al.*, 2001; Tranchant e Thompson *et al.*, 2004). Apesar dos benefícios demonstrados empiricamente na utilização do DOPE como co-lípido, a escolha deste deve ter como base a estrutura e actividade pretendida para o complexo lipossoma catiónico-DNA. O colesterol também pode ser utilizado como co-lípido, resultando na maioria das vezes, complexos mais estáveis, mas menos eficientes do que no caso do DOPE.

hidroxilações, metilações, etc., da parte polar podem influenciar a eficácia da transfecção (Lasic e Templeton, 1996). De um modo geral a actividade de transfecção dos lípidos catiónicos diminui com o aumento do comprimento e saturação da cadeia acil. Foi demonstrada também uma correlação directa entre a natureza do grupo de ligação dos lípidos catiónicos e o seu potencial citotóxico. Lípidos com ligações éter (ex. DOTMA, DMRIE) são mais tóxicos do que os que contêm ligações éster (ex. DOTAP) (Lima e Simoes *et al.*, 2001).

4. FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS-DNA (LIPOPLEXOS)

É do consenso geral que o modo de formação dos lipoplexos determina fortemente as suas características físico-químicas e, conseqüentemente, modela a sua actividade biológica. Ao longo dos

anos diversos modelos foram propostos para explicar a formação dos complexos lípidos catiónicos-DNA. Inicialmente foi proposto que os lipoplexos eram o resultado da ligação entre quatro lipossomas catiónicos ao plasmídeo, por interações electrostáticas. Gershon e colaboradores, com observações de microscópio electrónico, propuseram um modelo diferente no qual em uma razão de carga baixa lípido-DNA (+/-), os lipossomas são adsorvidos na superfície das moléculas de DNA formando agregados que progressivamente vão rodeando as moléculas de DNA. A adição contínua de lipossomas até uma concentração e densidade crítica, resulta numa fusão entre lipossoma e DNA, levando à colapso e condensação deste último (Gershon e Ghirlando *et al.*, 1993). Recentemente, estudos combinando microscopia óptica e a difracção de Raios X revelaram que a mistura de lipossomas catiónicos e DNA resulta na transição da estrutura lipossomal para líquido-cristalino, estrutura globular e condensada, consistindo em monocamadas de DNA, encaixadas entre bicamadas de lípidos catiónicos. No entanto, co-existem uma série de estruturas propostas para os lipoplexos. Actualmente a estrutura mais aceite é a de "finger-print", que é definida por sucessões alternadas de bicamada lipídica e moléculas de DNA. No entanto, cada autor tem a sua preferida o que é compreensível uma vez que é possível que lipoplexos preparados com lípidos diferentes apresentem estrutura diferentes.

4.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS

O tipo de lipossoma é essencialmente condicionado pelo seu método de preparação, devendo este, ser escolhido criteriosamente. Desde a publicação dos primeiros artigos

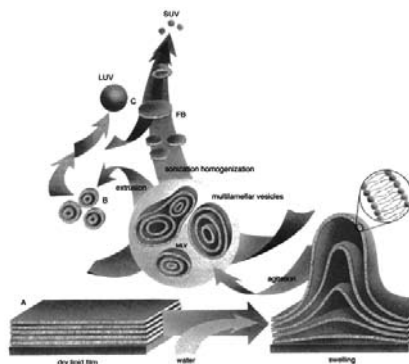


FIGURA 2 Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Adaptado de www.avantilipids.com.

descrevendo a preparação e caracterização de lipossomas multilamelares, vários métodos têm sido desenvolvidos a fim de criar lipossomas com diferentes tamanhos e características. Dentre estes métodos pode citar-se a preparação por injeção etanólica *freeze drying* (van Winden, 2003), o método de preparação por remoção do detergente (Schubert, 2003), por *reverse-phase evaporation* (Duzgunes, 2003) ou utilizando homogeneizadores de alta pressão (Rodriguez e Xamani, 2003).

Em escala laboratorial, as MLV, SUV e LUV são as vesículas lipídicas mais utilizadas. A preparação destes três tipos de suspensão lipídica e descrito sumariamente na Figura 2.

De um modo geral, a preparação dos lipossomas pode ser dividida em três fases consecutivas: preparação da fase aquosa e lipídica seguida de evaporação do solvente, hidratação do lípido e ainda, para a maioria dos sistemas, um processamento secundário, necessário para a obtenção do produto final (Santos e Castanho, 2002). No método de preparação por hidratação/extrusão, após a escolha da composição lipídica e do

solvente a utilizar, os volumes adequados são misturados e o solvente orgânico é evaporado até a secura, sob fluxo de azoto, de modo a formar um filme lipídico tão fino quanto possível. A hidratação do filme é feita adicionando ao balão contendo o filme, o volume desejado de solução aquosa escolhida, agitando-se suavemente. No fim desta etapa, dispõe-se já de uma suspensão de MLV. A partir daqui, várias alterações podem ser introduzidas nos protocolos de preparação dos lipossomas de modo a obter-se o tamanho de vesículas pretendido, com as características desejadas. Contudo, para a obtenção de SUV, apenas é necessário submeter as MLV obtidas, a sonicação seguida de ciclos de extrusão, através de membranas de policarbonato com o poro pretendido, utilizando para o efeito um extrusor. Este método tem a vantagem de ser rápido e requerer um equipamento de baixo custo (Mui e Chow *et al.*, 2003)

4.2. PARÂMETROS QUE AFECTAM AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOPLEXOS

Apesar do crescimento da investigação sobre os factores bioquímicos e biofísicos envolvidos na transferência de genes por lipossomas catiónicos, tais como características estruturais, associação celular e transporte intracelular, as relações existentes entre esses mecanismos de internalização dos lipoplexos pelas células ainda não estão inteiramente compreendidas (Almofiti e Harashima *et al.*, 2003). Para além dos factores cinéticos e termodinâmicos que afectam a formação dos lipoplexos, existem outras propriedades importantes para o sucesso da transfecção tais como morfologia, tamanho, densidade de carga e estabilidade coloidal. A concentração de lípido catiónico e DNA, a força iónica e temperatura do meio de suspensão, a ordem de adição dos compostos, bem como o grau de mistura e o tempo de formação dos complexos representam parâmetros críticos (Lasic e Templeton, 1996; Lima e Simoes *et al.*, 2001). A proporção relativa de lípido catiónico e DNA determinam em grande parte o tamanho, a carga superficial (potencial zeta), a eficácia de complexação, estabilidade coloidal e actividade biológica dos complexos.

5. INTERACÇÃO LIPOPLEXOS-CÉLULA

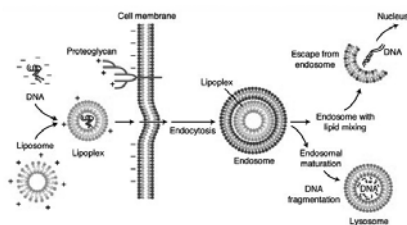
Apesar do uso extensivo dos lipossomas catiónicos para libertação de genes tanto *in vivo* como *in vitro*, os mecanismos pelos quais o DNA é libertado nas células ainda não está completamente entendido. Vários obstáculos, incluindo a membrana citoplasmática, endossomal e nuclear, são reconhecidos na transfecção mediada por lipossomas. A maior desvantagem dos lipoplexos como libertadores de genes é a sua baixa eficiência de transfecção comparada com os vectores virais. Isso acontece devido ao baixo tempo de vida dos complexos, assim como sua inactivação por proteínas do soro e a toxicidade em elevadas concentrações (Zhdanov e Podobed *et al.*, 2002). De uma maneira geral (Fig. 3), os lipoplexos fundem com a membrana citoplasmática da célula, sendo internalizados por endocitose. Como resultado, forma-se uma vesícula revestida por uma membrana dupla, o endossoma. Durante a maturação do endossoma, a parede endossomal pode romper-se, libertando o DNA para o citoplasma. O DNA que alcança o núcleo irá ser expresso. Alternativamente, o DNA pode continuar na via endocítica, acabando por ser degradado no interior dos lisossomas (Parker e Newman *et al.*, 2003).

5.1. ENTRADA DOS LIPOPLEXOS NAS CÉLULAS

Os complexos lípido-DNA podem ser internalizados nas células por dois processos: (1) através da fusão directa com a membrana celular; (2) por endocitose com subsequente destruição do endossoma dentro da célula (Zabner 1997; Lima e Simoes *et al.*, 2001). Estas duas vias não são exclusivas e podem ocorrer a várias extensões dependendo do tipo, confluência e idade das células, bem como do tamanho e carga dos lipoplexos. A maioria dos estudos realizados indica que a internalização dos lipoplexos é feita maioritariamente por endocitose (Duzgunes e Nir 1999; Lima e Simoes *et al.*, 2001; Almofti e Harashima *et al.*, 2003). Apesar disso, a fusão membranar assim como a interacção com as células pelos lipoplexos, representa um evento importante na entrada dos lipoplexos na células. No entanto, a contribuição deste processo tem-se revelado irrelevante na libertação intracelular dos genes (Pires e Simoes *et al.*, 1999). Baseado nestas evidências, têm sido feitas tentativas a fim de melhorar a internalização dos lipoplexos pelas células utilizando sistemas de lípidos catiónicos direccionados par células específicas. Estes são obtidos através da associação de ligandos (proteínas ou péptidos) ou anticorpos direccionados a receptores mediadores da endocitose. Por exemplo, a associação de transferrina aos lipoplexos aumenta a transfecção numa grande variedade de células (de Ilarduya e Arangoa *et al.*, 2002; Simoes e Pires *et al.*, 2003).

5.2. LIBERTAÇÃO DO DNA PARA O CITOPLASMA

A libertação do material genético no citoplasma é um passo crucial a fim de evitar-se a degradação do DNA a nível dos lisossomas.



LIPOPLEX-MEDIATED TRANSFECTION AND ENDOCYTOSIS
Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press

FIGURA 3 Esquema representativo do processo de transfecção mediada por complexos de lipossomas catiónicos-DNA. Adaptado de:

<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03006574h.htm>

De que forma os lipoplexos induzem a destruição do endossoma para ter acesso ao citoplasma é uma questão que ainda está por resolver. No entanto, foi proposto que a destabilização da membrana endossomal pelos complexos internalizados é originada por um flip-flop dos lípidos aniónicos da camada exterior para a camada interior, voltada para o lúmen do endossoma. A formação de um par de iões com carga neutra resulta na deslocação do DNA desse complexo, tendo os lípidos catiónicos um papel principal na libertação do DNA no citoplasma (de Lima e Simoes *et al.*, 2001) A este nível, o lípido neutro DOPE, tem um importante papel: promove a fusão do complexo com a membrana endossomal sob condições ácidas, permitindo assim, a libertação do DNA no citoplasma. Além disso, DOPE, também auxilia a dissociação do DNA dos lipoplexos devido à capacidade dos seus grupos amina competirem com os lípidos catiónicos pelos grupos fosfato presentes no DNA (Bally e Harvie *et al.*, 1999).

5.3. ACESSO DO DNA AO NÚCLEO

Uma vez no citoplasma, o DNA tem que ultrapassar a membrana nuclear para que a transcrição ocorra. Também neste caso

o conhecimento sobre o transporte do DNA para o núcleo ainda é escasso. Assumindo que o DNA está livre de lípidos, espera-se um movimento rápido deste em direcção ao núcleo, evitando assim, a sua degradação pelas nucleases. Na ausência de divisão celular, ainda não está clarificado se o DNA penetra a membrana nuclear através de poros por um processo de difusão passiva, ou através de um mecanismo envolvendo transporte activo. O primeiro modo de entrada é pouco provável de ocorrer uma vez que os poros actuam de forma selectiva evitando a livre troca de macromoléculas maiores que 70 kDa, o qual é significamente menor que o peso molecular do DNA. Outra questão pertinente está relacionada com o grau de condensação/compacção do DNA quando ele atinge o núcleo. Neste estágio parece que uma cobertura parcial do DNA com lípidos poderia ser vantajoso, não só por reduzir o tamanho do plasmídeo, mas também por aumentar sua protecção contra as nucleases do citoplasma. Além disso, esses fragmentos de lípidos catiónicos associados ao DNA podem ter um papel na desorganização da membrana nuclear (de Lima e Simoes *et al.*, 2001).

6. TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS USANDO VECTORES NÃO VIRIAIS DO TIPO COMPLEXOS CATIÓNICOS LÍPIDO-DNA

A reparação de fracturas e de defeitos no osso, são normalmente alvo da cirurgia ortopédica. As terapias convencionais de autoenxertos, assim como aloenxertos podem promover bons resultados clínicos. No entanto são reconhecidas as limitações dessas terapias: os autoenxertos só podem ser feitos numa escala limitada causando muitas vezes morbidez substancial do local doador. Os aloenxertos apresentam elevado potencial antigénico podendo também ser portadores de doenças. Em alternativa surge a utilização de biomateriais substitutos do osso. Todavia estes ainda colocam alguns problemas, como o aumento de reacções infecciosas e pobres propriedades biomecânicas. Assim, a modelação das vias biológicas responsáveis pela cura da fractura e osteogénese podem reduzir a incidência destas complicações aumentando a eficiência da osteogénese. As BMP's (bone morphogenetic proteins) têm sido descritas em muitos casos como sendo efectivas na deposição do tecido ósseo. No entanto, vários problemas têm sido colocados: a necessidade de elevadas doses, baixo tempo de vida e a falta de um método para a libertação sustentada destas proteínas exógenas. Assim, a terapia genética poderá ser um método alternativo para a libertação das BMP's nos tecidos, estimulando a osteogénese. O desenvolvimento de vectores continua a ser um dos grandes problemas em terapia genética, tanto do ponto de vista técnico como ético. Os diversos tipos de vectores são utilizados com o objectivo de transportar o DNA terapêutico ao núcleo das células-alvo, sendo os mais utilizados são os vectores virais, dado a sua eficiência na libertação intracelular do material genético. No entanto, os lipossomas catiónicos, sendo vectores não virais, podem constituir um bom método para a libertação de genes em células do tecido ósseo, dado a sua versatilidade e segurança. A avaliação da medida em que os lipossomas catiónicos constituem uma estratégia para a libertação de material genético em células do tecido ósseo está actualmente a ser alvo de investigação. Os avanços na investigação sobre o osso ou células do osso têm sido conseguidas devido à capacidade de desenvolver sistemas de modelos *in vitro*. Os estudos *in vitro* sobre o comportamento

dos osteoblastos utiliza tanto células do tipo osteoblastos (derivadas do osso de animais ou humanos), como linhas celulares provenientes de osteosarcomas. Estudos recentes têm revelado que as células do tipo osteoblástico são transfectáveis utilizando vectores lipossomas catiónicos, podendo constituir um bom método para a libertação de genes em células do tecido ósseo, dado a sua versatilidade e segurança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMOFTI, M.R., HARASHIMA, H., SHINOHARA, Y., ALMOFTI, A., BABA, Y., KIWADA, H. (2003). Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. *In: Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410(2), pp. 246-253.
- BALLY, M.B., HARVIE, P., WONG, F.M.P., KONG, S., WASAN, E.K., REIMER, D.L. (1999). Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(3), pp. 291-315.
- DA CRUZ M.T.G., SIMOES S., PIRES P.P.C., NIR S., DE LIMA M.C.P. (2001). Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex-cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity. *In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1510(1-2), pp. 136-151.
- DE ILARDUYA, C.T., ARANGO, M.A., MORENO-ALIAGA, M.J., DUZGUNES, N. (2002). Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1561(2), pp. 209-221.
- DE LIMA, M.C.P., SIMOES, S., PIRES, P., FANECA, H., DUZGUNES, N. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), pp. 277-294.
- DUZGUNES, N., NIR, S. (1999). Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1-2), pp. 3-18.
- DUZGUNES, N. (2003). Preparation and Quantitation of Small Unilamellar Liposomes and Large Unilamellar Reverse-Phase Evaporation Liposomes. *In: Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp.23-27.
- GERSHON, H., GHIRLANDO, R., GUTTMAN S.B., MINSKY A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *In: Biochemistry*, 32(28), pp. 7143-7151.
- KIKUCHI, H., SUZUKI, N., EBIHARA, K., MORITA, H., ISHII, Y., KIKUCHI, A., SUGAYA, S., SERIKAWA, T., TANAKA, K. (1999). Gene delivery using liposome technology. *In: Journal of Controlled Release*, 62(1-2), pp. 269-277.
- LASIC, D.D., TEMPLETON N.S. (1996). Liposomes in gene therapy. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 20(2-3), pp. 221-266.
- LIMA, N., MOTA, M. (2003) *Biotechnology, fundamentos e aplicações*. 1ª ed. Lisboa: Lidel.
- Monkkonen, J., Urtti A. (1998). Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(1), pp. 37-49.
- MUI, B., CHOW, L., HOPE, M.J. (2003). Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. *In: Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp. 3-14.
- PIRES, P., SIMOES, S., NIR, S., GASPAR, R., DUZGUNES, N., DE LIMA, M.C.P. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1418(1), pp. 71-84.

- RODRIGUEZ, R.B., XAMANI M.S. (2003). Liposomes Prepared by High-Pressure Homogenizers. In: *Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp. 28-46.
- SANTOS, N.C., CASTANHO, M.A.R.B. (2002). Lipossomas: a Bala Mágica Acertou? In: *Química Nova On Line*, pp. 1055-1225.
- SCHUBERT, R. (2003). Liposome Preparation by Detergent Removal. In: *Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp. 46-70.
- SIMÕES, S., PIRES, P. (2003). Gene Delivery by Cationic Liposome-DNA Complexes Containing Transferrin or Serum Albumin. In: *Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp. 369-383.
- TRANCHANT, I., THOMPSON, B., NICOLAZZI, C., et al. (2004). Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. In: *The Journal of Gene Medicine*, 6(S24-S35) Suppl. 1, pp. 24-35.
- TSENG, W.C., HUANG, L. (1998). Liposome-based gene therapy. In: *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1 (5) Aug., pp. 206-213.
- VAN WINDEN, E.C.A. (2003). Freeze-Drying of Liposomes: Theory and Practice. In: *Liposomes, PT a Methods in Enzymology*, 367, pp. 99-110.
- ZABNER, J. (1997). Cationic lipids used in gene transfer. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 27, pp. 17-28.
- ZHDANOV, R.I., PODOBED O.V., VLASSOV V.V. (2002). Cationic lipid-DNA complexes--lipoplexes--for gene transfer and therapy. In: *Bioelectrochemistry*, 58(1), pp. 53-64.
- ZUIDAM, N.J., BARENHOLZ Y. (1998). Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1368(1), pp. 115-128.