

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIPOSSOMAS DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES PARA
ENTREGA INTRACELULAR DE QUANTUM DOTS

Aluna: Anna Lívia Linard Matos
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes
Co-orientadora: Dra. Goreti Pereira

Recife, Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIPOSSOMAS DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES PARA ENTREGA INTRACELULAR DE QUANTUM DOTS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, para obtenção do
título de mestre.

Aluna: Anna Lívia Linard Matos
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes
Co-orientadora: Profa. Dra. Goreti Pereira

Recife, Fevereiro de 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Matos, Anna Livia Linard

**Lipossomas de diferentes composições para entrega intracelular de
Quantum dots/ Anna Livia Linard Matos– Recife: O Autor, 2015.**

51 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes

Coorientadora: Goreti Pereira

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências
Biológicas, 2015.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Células 2. *Quantum dots* 3. Lipossomas I. Fontes, Adriana
(orientadora) II. Pereira, Goreti (coorientadora) III. Título**

571.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-115

ANNA LÍVIA LINARD MATOS

**“LIPOSSOMAS DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES PARA ENTREGA
INTRACELULAR DE QUANTUM DOTS”**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito final para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração: Biotecnologia.

Data da aprovação: 26/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Fontes – (Orientador/UFPE)

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues – (UFPE)

Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva

"Há coisas de difícil aceitação, e há coisas que, a depender da forma como forem encaradas, poderão ganhar sentido para esta e posteriores ocasiões. Viver significa administrar bem as ocasiões quando se nos vierem a apresentar, e a vida ganha sentido à medida que o sentido da vida podemos enxergar. A vida, por si mesma, é dom de graça que podemos estragar ou, por seu meio, superar limites"

Padre Airton Freire

AGRADECIMENTOS

Com a certeza de que Deus olha e cuida de nós sempre, acredito que Ele ponha pessoas em nossas vidas que na realidade são verdadeiros anjos na Terra.

Agradeço à Deus, Pai Celestial, por tudo em minha vida, pelas oportunidades, pelas conquistas e pelas derrotas, pelas pessoas que dividem essa jornada conosco. Sem Ele nada teria sentido.

Esses anjos do nosso convívio são extremamente especiais, gostaria que soubessem o quanto são amados, queridos e necessários. Tenho o prazer de conviver diariamente com alguns, e tenho uma enorme saudade dos que estão distante fisicamente.

Minha querida orientadora, Dri, agradeço por toda a paciência que tens comigo, pela atitude de mãe e amiga cuidadosa que sempre tem demonstrado ao longo dos anos de convivência e orientação.

Goreti de Braga, um sincero obrigada não é suficiente para expressar gratidão por tudo o que fez por mim, obrigada por ser minha co-orientadora e tentar meter um pouco de juízo na minha cabeça, beijinhos!

Paulinho, que grande irmão a vida me deu hein? Não sabia que era possível ter tanta sincronia com alguém tão diferente mas parecidos no fim. É muito gratificante dividir a bancada e a gargalhada com você todos os dias. Tu és uma inspiração.

Cida, amiga mais que especial, me faz tão bem. Obrigada por toda a ajuda que já me destes e continuas a dar. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas e risadas sinceras.

Rafinha, *brother*, quem diria que aquela amizade criada no laboratório iria percorrer tantos quilômetros de momentos e histórias para contar? Um grande coração você tem, nunca esqueça disto. Sou grata por tudo que me ensinastes, sobre pesquisa, sobre a vida. És um exemplo!

Isabela e Carinna, meninas vocês são as parceiras que todo mundo deveria ter. Me sinto muito rica por poder contar com vocês para o que der e vier. Obrigada pela amizade sincera.

Bê, saibas que é uma pessoa que me inspira diariamente, não me cansas de surpreender. Te desejo muita luz, obrigada por tudo, todos os momentos e incentivos.

Obrigada aos demais QDotados, vocês florescem alegria! Obrigada ao Laboratório de Biofísica-Química por ser um lar pra mim. Aline Pitt, Rogério, Dewson, João Paulo, Natália, Carlos, Livia, Gilvânia, Rafael Japa, Regina, Thiago, Poline, Osnir, Diego, Camila, Bruna, Yago, Marília, Mariana, Wadja, Ana Paula, Aline Lima, Cláudia, Ricardo e Giovannia, vocês que me aguentam todo santo dia, se doam pela pesquisa, sou muito grata pela companhia, pelos desabafos e risos.

Seu Fredson obrigada pela descontração, pelo momento mais esperado do dia, o ‘*happy hour*’!

Obrigada a Alê, Gaby e Karina pela ajuda com a microscopia eletrônica de transmissão. Nunca irei esquecer a gentileza e o profissionalismo de vocês.

Meus amigos e amigas, minha gratidão por estarem comigo em todos os momentos. Acompanhando de pertinho ou prestando atenção longe, vocês são essenciais.

Minha família linda e amada, Mamãe Amélia, Papai Emar, Giulia, Geórgia, Guilherme, Tia Mona, Vovô Maragton, Vovó Eailce, saibam que vocês são o motivo de eu estar onde estou. São minha luz e incentivo, mãos acolhedoras, palavras de conforto, e um possuem corações repletos de amor. Vocês são minha vida.

Flavinha, Aline, Júlia, Lívia, Ana Maria, obrigada por terem compartilhado um pouco de suas vidas comigo, me ensinado muito mais do que eu jamais poderia ter ensinado. Obrigada por dividirem e terem dividido os seus dia-a-dia comigo. Convivência essa que nunca terá substituição, guardarei pra sempre os nossos melhores momentos no Sobrado, vocês são irmãs que Recife me deu. Sou extremamente grata.

À UFPE, ao CCB e CCS por serem um local de muito aprendizado e crescimento.

Obrigada à FACEPE pelo auxílio financeiro concedido.

Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Ensaio baseado em fluorescência possuem alta sensibilidade, o que pode proporcionar a identificação e quantificação de biomoléculas e ajudar a elucidar diversos eventos celulares. O desenvolvimento de novas sondas fluorescentes, tais como os *Quantum Dots* (QDs), tem permitido aos pesquisadores usufruir de todo o potencial de fluorescência. QDs são nanopartículas de materiais semicondutores, de 2 a 10 nm, que possuem características ópticas únicas, tais como fotoestabilidade. Todavia sua utilização no estudo intracelular ainda é limitada, pois sua passagem através da membrana celular não se dá passivamente, ficando preso em vesículas endocíticas, necessitando assim de um método que realize a sua entrega livre no citosol. Dentre algumas metodologias já descritas para entrega intracelular de QDs destacam-se a eletroporação, microinjeção e a fixação celular. Todavia, essas apresentam algumas desvantagens, sendo metodologias laboriosas ou danosas às células. Dentro dessa realidade os lipossomas fusogênicos aparecem como uma ferramenta capaz de sanar essas desvantagens, por serem vesículas de bicamadas lipídicas que podem se fundir às células liberando seu conteúdo no citosol. Assim, neste trabalho teve-se como objetivo desenvolver dois métodos utilizando lipossomas para carrear QDs hidrofílicos ao interior de células vivas. Primeiramente QDs de CdTe aniônicos foram encapsulados em lipossomas de fosfatidilcolina, catiônicos (contendo DOTAP) e fusogênicos (contendo DOPE, DOTAP e DPPE-Rh). A análise por microscopia de fluorescência de hemácias e células tronco incubadas com os lipossomas fusogênicos contendo os QDs negativos, evidenciou que os QDs ficaram ligados à membrana celular devido à diferença de cargas negativas dos QDs e positivas dos lipídeos. Portanto, na continuidade deste trabalho uma segunda abordagem, baseada no método de injeção em etanol, foi desenvolvida para a encapsulação de QDs e aplicada para os mesmos tipos de lipossomas anteriormente descritos. Nessa segunda metodologia, os QDs de CdTe positivos foram também utilizados, de forma a evitar a interação eletrostática entre os QDs e os lipídeos. Para ambos os métodos desenvolvidos, os lipossomas foram caracterizados por medidas de potencial zeta, de raio hidrodinâmico, microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão, confirmando que houve a encapsulação de QDs para todos os sistemas lipossomais utilizados. Ao longo de todo o estudo as hemácias foram células modelo importantes para avaliar a fusão dos lipossomas com a membrana celular, pois estas não apresentam atividade endocítica. Os lipossomas de fosfatidilcolina e catiônicos serviram de modelo para desenvolver as duas metodologias de encapsulação que posteriormente foram aplicadas aos fusogênicos. Os estudos feitos com hemácias e células HeLa, utilizando a segunda metodologia de encapsulação e lipossomas fusogênicos, sugerem a entrega dos QDs positivos nas células vivas. No entanto, estudos adicionais precisam ser desenvolvidos para comprovar se os QDs positivos se encontram livres ou não no citosol. Este novo método apresenta ainda potencialidade para a encapsulação de QDs bioconjugados, pois o processo de congelamento do anterior poderia desnaturar as proteínas. Esperamos que este estudo possa ajudar no desenvolvimento de métodos efetivos de liberação de QDs no citosol, de forma que seja possível se utilizar as vantagens dessas sondas fluorescentes para melhor compreender vários processos intracelulares.

Palavras-chave: Fluorescência, Quantum Dots, Lipossomas, Células

ABSTRACT

Fluorescence-based assays have high sensitivity, which can provide the identification and quantification of biomolecules and help elucidate cellular events. The development of new fluorescent probes such as Quantum Dots (QD) has enabled researchers to take advantage of the full fluorescence potential. QDs are semiconductor nanoparticle materials from 2 to 10 nm which have unique optical properties such as photostability. However, their use in intracellular study is limited because its passage through the cell membrane does not occur passively, getting stuck in endocytic vesicles, thus requiring a method to conduct their free delivery in the cytosol. Among some methods already described for the intracellular delivery of the QDs include electroporation, microinjection and cell attachment. However, these have disadvantages, like being laborious methods or damaging the cells. Within this reality, the fusogenic liposomes appear as a tool to solve these drawbacks, being vesicles of lipid bilayers that can merge the cells releasing its contents into the cytosol. Thus, this study was aimed to develop two methods using liposomes to adduce hydrophilic QDs inside living cells. First of anionic CdTe QDs were encapsulated in phosphatidylcholine liposomes, cationic (containing DOTAP) and fusogenic (containing DOPE, DOTAP and DPPE-Rh). Analysis by fluorescence microscopy of stem cells and red blood cells incubated with the fusogenic liposomes containing the negative QDs, the QDs showed that they were bound to the cell membrane due to the difference of negative and positive charges of QDs and lipids, respectively. Therefore, the continuation of this work a second approach based on the ethanol injection method has been developed for encapsulating and implemented QDs for the same types of liposomes described above. In this second method, the positive CdTe QDs were also used in order to prevent electrostatic interaction between the lipid and the QDs. For both developed methods, the liposomes were characterized by zeta potential measurements, hydrodynamic radius, fluorescence microscopy and transmission electron confirming that there was encapsulating QDs for all liposomal systems used. The study with red blood cells were important to assess the fusion of the liposomes with the cell membrane, because they do not have the endocytic activity. The cationic and the phosphatidylcholine liposomes served as a model to develop methods for encapsulation, and subsequently applied to the fusogenic. Studies done with red blood cells and HeLa cells using the second method of encapsulation and fusogenic liposomes, suggest delivery of positive QDs in living cells. However, additional studies are needed to see if the positive QDs are free or not in the cytosol. This new method also has potential for encapsulating QDs bioconjugates because the freezing process, used before, may denature proteins. We hope that this study may help in the development of effective methods of QDs release in the cytosol, so being possible to use the full advantages of these fluorescent probes to better understand several intracellular processes.

Keywords: Fluorescence, Quantum Dots, Liposomes, Cells.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Comparação da cor da emissão em função do tempo, relacionada à fotoestabilidade de QDs (vermelhos) e o corante Alexa Flúor (verde).	1
Figura 2 - Estrutura de um QD (em azul) bioconjugado a uma biomolécula.	2
Figura 3 - Lipossoma contendo QDs, fundindo-se com a membrana plasmática e liberando os QDs intracelularmente.	3
Figura 4 - QDs com tamanhos diferentes em função da sua fluorescência.	6
Figura 5 - Redução do tamanho de partículas semicondutoras, comparando os QDs e o bulk (cristal macroscópico).	7
Figura 6 - Efeito da passivação na superfície dos QDs.	7
Figura 7 - Estrutura de um QD fluorescente conjugado a uma biomolécula.	8
Figura 8 - (A) O tecido mamário, onde os QDs (vermelhos) se ligam especificamente a receptores Her2. (B) Podemos visualizar os tumores in vivo.	9
Figura 9 - Métodos para introduzir nanomaterial no citoplasma, (A) microinjeção, (B) eletroporação e (C) lipossomas fusogênicos.	12
Figura 10 - Entrega dos aglomerados de QDs (A) e a fluorescência de uma única célula do embrião de <i>Xenopus sp</i> (B).	12
Figura 11 - (A) Fosfolipídeos; (B) Bicamada lipídica; (C) Detalhe das moléculas fosfolipídicas e seu arranjo como bicamada; e, (D) Lipossoma.	13
Figura 12 - Esquema da geometria das moléculas anfifílicas. (A) Lipídeos tipo cone. (B) Geometria cilíndrica. (C) Estruturas com curvatura inversa são formadas.	14
Figura 13 - Representação da bicamada lipídica e dos tipos de lipossomas quanto as suas diferenças morfológicas.	15
Figura 14 - Membranas celulares de HEK293 e células musculares lisas marcadas pelos lipossomas fusogênicos contendo Rodamina B e BODIPY FL-DHPE, vermelho e verde respectivamente. Barras: 10 μ m.	16
Figura 15 - Variedade de aplicações dos lipossomas fusogênicos dependendo de sua composição. (A) Visualização da membrana plasmática, (B) incorporação de proteína transmembrana na membrana celular, (C) funcionalização da superfície celular, e (D) entrega de material no citoplasma.	17
Figura 16 - Representação esquemática de três abordagens diferentes para carrear NPs em lipossomas.	19
Figura 17 - Interação dos lipossomas com células HEK293, (A) internalização dos lipossomas sem PEG, e (B) fusão dos lipossomas contendo PEG.	20
Figura 18 - Entrega de QDs através de lipossomas em células progenitoras gliais (A1) e em células HeLa (B1). Barras: 20 μ m.	20
Figura 19 - Escala de tempo de fusão de lipossoma fluorescente com células progenitoras gliais, nenhum sinal em (A) 0 min, (B) fluorescência em 5 min, (C) 15 min e (D) máximo em 60 min. Barras: 20 μ m.	21
Figura 20 - Esquema dos lipossomas encapsulando QDs (vermelho), e a ligação via biotina-estreptavidina aos QDs (verde) ligados ao EGF.	22
Figura 21 - Marcação celular dos lipossomas marcados e não marcados.	23

Fig. 1 - CdTe QDs' optical characterization. Normalized absorption (solid line) and emission (dot line) spectra. _____32

Fig. 2 - Fluorescence microscopy images of CdTe QD loaded liposomes. (A) Encapsulation of green QDs in PC liposomes. (B) Encapsulation of QDs in cationic DOTAP-containing liposomes (20% DOTAP). Bars: 10 μm . _____32

Fig. 3 - Zeta potential of different liposomal systems. Asterisks indicate the encapsulated QDs, while their absence indicates empty vesicles. A decay in zeta potentials was observed in the presence of the MPA-coated QDs for all the liposomal systems. _____33

Fig 4 - Fusion of liposomes with stem cells observed by fluorescence microscopy. (A) All cells are labeled by fusogenic liposomes. (B) Fluorescence of membrane projections may be observed (arrows). (C) Different patterns of cellular labeling during/after fusion. Cells 1 and 2 display intracellular fluorescence rather than on the surface. (D) Zoom of the region marked in C showing the arrival of the vesicle followed by membrane fusion. Bars: (A): 100 μm ; (B): 25 μm ; (C–D): 75 μm . _____34

Fig. 5 - Conditions under which fusion does (or does not) occur. (A) Confocal image shows that fusion still occurs during incubation at low temperature. (B) We observe the fluorescence of a single cell in the sample when a ten-fold reduction in the amount of fluorescent lipids is used. (C) Fluorescence image of the labeled cell shown in (B) displaying the same features after fusion. Arrows show membrane details. (D) We observe the lack of membrane labeling after incubation in the presence of serum proteins. Bars: (A) 75 μm ; (B–D): 25 μm . _____34

Fig. 6 - Intracellular delivery of QDs mediated by fusogenic liposomes. (A–C) DIC, red liposome signal and green QD signal after incubation with stem cells. (D)Fluorescence overlay showing co-localized emission. (E) Merged fluorescence and DIC images. Bars: 50 μm _____35

Fig. 7 - (A) Frames of co-localized signals of liposomes (red) and QDs (green) on the RBC surface after membrane fusion. (B) QD adsorption onto the surface of PC:DOTAP GUVs (5% of DOTAP lipids) for simulating fusogenic liposomes and further understanding the co-localized signal and interactions of negatively charged QDs and cationic lipids. Bars in (A): 3 μm and in (B): 25 μm . _____3

5

Fig. 8 - Illustration of the liposome-mediated QD delivery into cells. Under ideal conditions, after incubation, red fluorescent liposomes interact and fuse with the cell membrane (A1), releasing encapsulated QDs into the cytosol (A2). However, after fusion, charge mediated interactions of MPA-QDs and cationic lipids (B1) impair QD release into the cell, yielding a yellow co-localized signal (B2). _____36

MANUSCRITO

Fig. 1: CdTe-Cis QDs optical characterization. Absorption (dashed line) and emission (line) spectra. _____42

Fig. 2: QDs loaded PC liposomes fluorescence, phase contrast (A) and fluorescence microscopy (B). Bars: 10 μm . _____43

Fig. 3: Plain fusogenic liposomes (A) and loaded QD (B) TEM images. _____43

- Fig 4:** Representative analysis used for characterizing the homeostasis by the SSC x FSC plot (A) and the fusion of DPPE-Rh liposomes with RBCs (B)._____44
- Fig. 5:** Plain fusogenic liposomes labeling RBCs, contrast phase (A) and its fluorescence (B). Bar: 10 μ m._____44
- Fig. 6:** QDs loaded fusogenic liposomes labeling RBCs, red lipid fluorescence (A), green emitting QDs fluorescence (B) and the overlay (C). Bar: 10 μ m._____44
- Fig. 7:** QDs loaded fusogenic liposomes labeling HeLa cells. The blue fluorescence is from DAPI. The arrow and the asterisks indicate the green QDs fluorescence._____45

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Métodos para entrega de QDs em células vivas. _____ 11

MANUSCRITO

Table I - Different DOTAP ratios and its influence on RBC, in 1 minute of incubation. _____ 44

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: ácido mercapto-propiónico

AMS: ácido mercaptosuccínico.

BC: banda de condução.

BODIPY FL-DHPE: N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionil)-1,2-dihexadecanoil sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

BV: banda de valência.

CdS: sulfeto de cádmio

CdSe/ZnS: seleneto de cádmio passivado com sulfeto de zinco.

CdSe: seleneto de cádmio.

CdTe: telureto de cádmio.

CdTe-AMP: telureto de cádmio estabilizado/funcionalizado com ácido mercapto-propiónico.

CdTe-AMS: telureto de cádmio estabilizado/funcionalizado com ácido mercaptosuccínico.

CdTe-Cis: telureto de cádmio estabilizado/funcionalizado com cisteamina.

Cis: cisteamina.

DiO: DiOC18(3)3,3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato.

DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.

DOPC+: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina.

DOPE: 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina.

DOPE-Rh: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil).

DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano.

DPPE-PEG2000: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamine-N-[metoxi(polietileno glicol 2000)].

DPPE-Rh: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil).

DSPE: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina.

EGF: fator de crescimento epidermal do inglês Epidermal Growth Factor.

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal.

Folato-PEG-CHEMS: folato-PEG-hemissuccinato de colesterol.

FWHM: largura à meia altura.

GUVs: vesículas unilamelares gigantes.

HeLa: células de adenocarcinoma cervical humano.

HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

LA: lipídeo associado à grupo aromático.

L-FLUO: lipídeo covalentemente ligado a fluorocromo.

LUVs: vesículas unilamelares grandes.

MLVs: vesículas multilamelares.

mPEG-DSPE: monometoxi de polietileno glicol 2000-diestearoil-fosfatidiletanolamina.

MVVs: vesículas multivesiculares.

NDB-PC: 1-oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfocolina.

OPPC: 1-oleoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

PC: fosfatidilcolina.

PE: fosfatidiletanolamina

PEG: polietilenoglicol.

POPC: 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina.

QDs: Quantum Dots.

HEK293: células de rim embrionário humano.

SUVs: vesículas unilamelares pequenas.

TMR-DHPE: N-(6-tetrametilrodaminatiocarbamoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

TR-DHPE: vermelho Texas 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

ZnS: Sulfeto de Zinco.

β -BODIPY-C12HPC: 2-(4,4-difluoro-5-metil-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-3-dodecanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

β -BODIPY-C5-HPC: 2-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4adiaza-s-indacene-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	1
II – OBJETIVOS	5
III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. QUANTUM DOTS (QDs)	6
2. MÉTODOS DE ENTREGA INTRACELULAR DE QDs	10
3. LIPOSSOMAS	13
4. ENCAPSULAÇÃO DE QDS EM LIPOSSOMAS	18
IV – REFERÊNCIAS	24
V – ARTIGO PUBLICADO	28
VI – MANUSCRITO	38
VII – CONCLUSÃO	46
VIII – PERSPECTIVAS	47
IX – ANEXOS	48

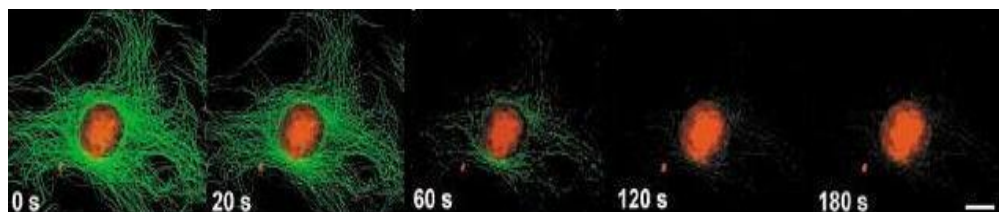
I – INTRODUÇÃO

Um dos objetivos mais almejados em Ciências da Vida é a compreensão das diversas interações entre as biomoléculas e, conseqüentemente, da atividade das células tanto em organismos simples, quanto em sistemas mais complexos. Esse entendimento pode, por exemplo, responder quando ocorrem as transformações de células sadias em tumorais ou como acontece a implantação de células tronco em terapias. Uma forma de elucidar a natureza dessas interações é através da utilização de técnicas baseadas em fluorescência (ZHANG et al. 2002). Essas técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade, e também permitem o acompanhamento da dinâmica de eventos biológicos em tempo real (GIEPMANS et al. 2006). As sondas empregadas podem ser bastante diversificadas, mais comumente são utilizados os corantes orgânicos (tais como a fluoresceína e a rodamina (RESCH-GENGER et al. 2008), porém as proteínas fluorescentes também vêm ganhando espaço.

Contudo, essas sondas (em especial os corantes orgânicos) apresentam algumas desvantagens que dificultam os experimentos baseados em fluorescência, por exemplo: (1) possuem um largo espectro de emissão podendo levar a resultados falsos positivos ou falsos negativos devido à superposição de sinais quando mais de um corante for utilizado, (2) elevada citotoxicidade e, principalmente, (3) alta taxa de fotodegradação (MICHALET et al. 2005). Dessa forma, o desenvolvimento e a utilização de marcadores fluorescentes, que possam superar as desvantagens dos corantes convencionais, são de grande importância.

Os nanocristais fluorescentes de semicondutores (*quantum dots* – QDs, também conhecidos como pontos quânticos) estão cada vez mais substituindo as sondas fluorescentes convencionais. A razão é que suas propriedades ópticas vêm complementando os pontos fracos dos sistemas anteriores, tais como: (1) uma única fonte de luz pode excitar a fluorescência dos nanocristais, que podem emitir em diferentes regiões do espectro conforme o tamanho da partícula, (2) baixa citotoxicidade, (3) estreito espectro de emissão permitindo múltiplas marcações e (4) a fluorescência dos QDs praticamente não sofre fotodegradação (assim como mostra Figura 1) (BRUCHEZ et al. 1998; CHAN et al. 1998).

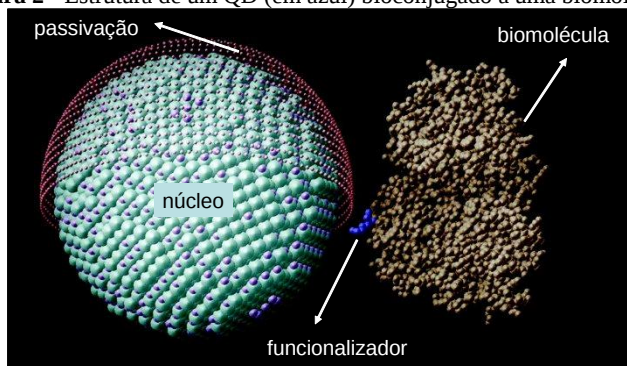
Figura 1 - Comparação da cor da emissão em função do tempo, relacionada à fotoestabilidade de QDs (vermelhos) e o corante Alexa Flúor (verde).



Fonte: Adaptado de MEDINTZ et al. (2005).

Os QDs apresentam uma nanoestrutura complexa composta de algumas camadas (Figura 2), onde: o núcleo é o coração da nanopartícula e determina suas propriedades ópticas; a camada de passivação é responsável pela qualidade da emissão e a fotoestabilidade; o agente estabilizante e funcionalizante confere a sua estabilidade química e possibilita posterior conjugação com biomoléculas (bioconjugação) e, por fim, a camada orgânica mais externa determina o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse.

Figura 2 - Estrutura de um QD (em azul) bioconjugado a uma biomolécula.



Fonte: Adaptado de MEDINTZ et al. (2005).

É nas marcações celulares onde o uso de QDs tem tido maiores progressos e atraído o maior interesse. No entanto, o recobrimento de sua superfície normalmente resulta num aumento do seu tamanho, podendo levar o QD a ter, por exemplo, até cerca de 20 nm. Com isso, pode haver certa dificuldade de direcioná-los a compartimentos localizados no interior das células vivas devido ao seu tamanho após conjugação às biomoléculas (DELEHANTY et al., 2008). Por essa razão, os QDs em geral são mais utilizados para marcação da membrana celular e quando chegam naturalmente no interior das células vivas, isso é feito através de processos de endocitose, que confinam os QDs em vesículas e não os deixam livres para marcar qualquer compartimento intracelular.

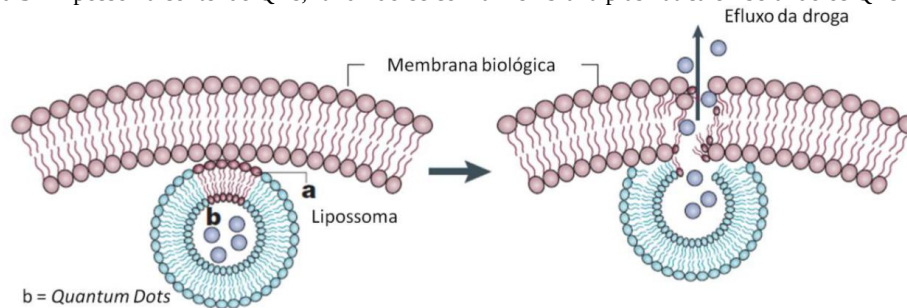
Existem, no entanto, algumas metodologias descritas para direcionar os QDs para compartimentos sub-celulares. As mais comuns são eletroporação, microinjeção, além da fixação e permeabilização celular, porém todas elas apresentam desvantagens. A primeira é baseada em choques elétricos capazes de formar poros nas membranas permitindo a entrada mas também a saída de materiais,

a segunda necessita da injeção de material célula por célula, e a última causa a morte das células (PINAUD et al., 2005). Dessa forma, há ainda a necessidade de direcionar quantidades relevantes dessas sondas de forma específica e efetiva para o interior de células vivas, com mínimos efeitos tóxicos, e escapando de rotas endocíticas, objetivo muito difícil de se alcançar com as técnicas citadas acima.

Um carreador efetivo de drogas e outros materiais e já bastante utilizado para entrega no interior de células é o lipossoma (TORCHILIN, 2005). Os lipossomas são formados por bicamadas lipídicas e por isso sua estrutura é muito semelhante à das membranas celulares. Dessa forma, eles podem sofrer, entre outros processos, internalização ou fusão com a membrana celular e veicular macromoléculas para o interior das células, seja liberando o material livre no citosol, seja liberando lentamente o material após internalização celular (AL-JAMAL e KOSTARELOS, 2011).

Como os lipossomas têm uma região hidrofílica e outra hidrofóbica (ou lipofílica), eles podem carrear vários tipos de substâncias. Como a entrada dos QDs nas células (sobretudo os funcionalizados, que têm tamanho maior) é complicada, encapsular QDs em lipossomas pode ser uma alternativa bastante interessante de entrega, pois os lipossomas mimetizam uma membrana biológica e podem carrear os QDs para o interior da célula. A Figura 3 ilustra a entrega de materiais encapsulados (por exemplo QDs) na célula através de um lipossoma. Dessa forma, QDs funcionalizados (por anticorpos ou drogas) poderiam então ser dirigidos para ligar especificamente a moléculas no interior das células, permitindo visualizar os eventos que acontecem em seu citosol, aliando diagnóstico e terapia numa única estrutura nanométrica. Como os métodos tradicionais de entrega de nanopartículas não são ainda totalmente efetivos para células vivas, nesse estudo objetivamos estudar sistemas de entrega de QDs mediado por lipossomas.

Figura 3 - Lipossoma contendo QDs, fundindo-se com a membrana plasmática e liberando os QDs intracelularmente.



Fonte: Adaptado de TORCHILIN (2005).

Em 2010, Csiszár e co-autores descreveram formulações de lipossomas que eram capazes de fundir com células (CSISZÁR et al., 2010). Em sua composição, existe um corante fluorescente, que quando associado a outros dois lipídeos (DOTAP¹ e DOPE²), é capaz de desestabilizar a membrana e

¹ 1,2-dioléil-3-trimetilamônio-propano.

causar a fusão dos lipossomas com as células, imprescindível para disparar o processo. Assim, o presente trabalho envolveu: (1) o preparo de lipossomas de diferentes composições, inclusive dos lipossomas fusogênicos propostos por Csiszár; (2) síntese de QDs catiônicos e aniônicos; (3) encapsulação lipossomal dos QDs e (4) veiculação dos QDs encapsulados em lipossomas em sistemas biológicos, principalmente em eritrócitos. Utilizar também QDs positivos (CdTe-Cis), testar a concentração dos lipídeos DOTAP (6) do DPPE-Rh nos lipossomas (7), além de utilizar outro método de preparo lipossomal (8), que permita o encapsulamento de QDs bioconjugados à proteínas, sem perda de atividade.

Parte dos resultados obtidos neste trabalho com QDs aniônicos encapsulados em lipossomas fusogênicos pelo método *freeze and thaw* foi associado à resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e publicados no *Journal of Material Chemistry B* [LIRA et al. 2013] e seguem no anexo desta dissertação. Nesse trabalho publicado observamos que havia uma co-localização das fluorescências dos QDs e do lipídeo associado à rodamina (DPPE-Rh³) quando analisamos a marcação dos sistemas biológicos, e acreditamos que esse resultado foi devido à diferença de carga entre os lipossomas catiônicos e os QDs aniônicos. Além disso, pelo método *freeze and thaw* não é possível encapsular bioconjugados de forma que ainda continuem funcionais.

² Fosfatidiletalonaamina.

³ 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil).

II – OBJETIVOS

1 - OBJETIVO GERAL:

Encapsular QDs carregados catiônicos e aniônicos em lipossomas de diferentes composições e observar as interações entre esses sistemas nanoestruturados e eritrócitos.

2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- (a) Sintetizar e caracterizar opticamente QDs carboxilados de CdTe-AMP e CdTe-AMS (QDs de telureto de cádmio funcionalizados e estabilizados com ácido mercapto-propilônico e ácido mercaptosuccínico) e QDs aminados de CdTe-Cis (telureto de cádmio funcionalizados e estabilizados por cisteamina);
- (b) Preparar e caracterizar lipossomas de variadas composições, como: PC; PC-DOTAP; DOPE-DOTAP e DOPE-DOTAP-LFLUO (lipídeo conjugado a um corante fluorescente), contendo ou não QDs.
- (c) Monitorar a interação dos diferentes lipossomas contendo QDs com sistemas biológicos, especialmente eritrócitos.

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. QUANTUM DOTS (QDs)

Nanocristais fluorescentes de materiais semicondutores ou apenas *Quantum Dots* (QDs) constituem uma nova classe de sondas fluorescentes. Os QDs são promissores, pois suas características superam algumas desvantagens associadas às sondas convencionais (mais conhecidos como corantes orgânicos), como: alta taxa de fotodegradação (o que dificulta a aquisição de imagens por tempos prolongados), elevada citotoxicidade e um largo espectro de emissão. Quando mais de um corante orgânico for utilizado na marcação fluorescente pode haver resultados falso positivos ou falso negativos devido à superposição de sinais, (MICHALET et al., 2005).

Os QDs possuem diâmetros entre 2 a 10 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Alguns materiais semicondutores quando têm seu tamanho reduzido à escala nanométrica apresentam propriedades espectroscópicas vantajosas frente aos corantes orgânicos tradicionais e tais vantagens são determinadas pelo tamanho das nanopartículas, (Figura 4), e não apenas pela sua composição química (MEDINTZ et al., 2005; MICHALET et al., 2005). Ou seja, para um mesmo material, a emissão de luz pelos QDs pode ser sintonizada de acordo com seu tamanho. QDs maiores vão emitir mais para o vermelho, enquanto os menores vão emitir em regiões mais próximas do azul no espectro eletromagnético.

Figura 4 - QDs com tamanhos diferentes em função da sua fluorescência.

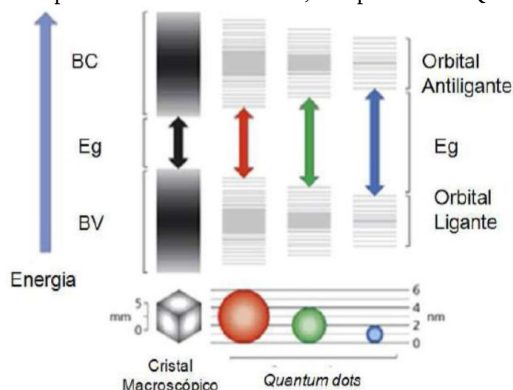


Fonte: Adaptado de NIE et al. (2007).

Os materiais semicondutores são caracterizados por possuírem uma estrutura composta de uma banda de valência (BV) ocupada por elétrons, uma banda de condução (BC) sem elétrons e por um *band gap* (uma banda proibida) que separa a BC da BV (SANTOS et al., 2008). Com o efeito da diminuição do tamanho dos materiais semicondutores para a escala nanométrica (QDs), ocorre um alargamento do *band gap* e o aparecimento de níveis discretos entre a BC e a BV (Figura 5). Sob a incidência de luz, os elétrons são promovidos da BV para a BC, e quando retornam ao estado inicial na BV há a emissão de fluorescência. Devido à emissão estar associada ao *band gap*, quanto maior a energia do *band gap*, menor

será o comprimento de onda e vice-versa. Assim, quanto menores os QDs, maiores serão os *band gaps* e mais para o azul será sua fluorescência (SANTOS et al., 2008).

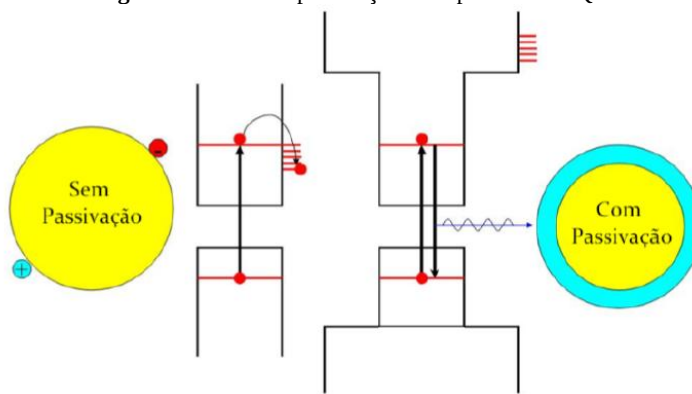
Figura 5 - Redução do tamanho de partículas semicondutoras, comparando os QDs e o bulk (cristal macroscópico).



Fonte: Adaptado de CHAVES (2006).

A relação área *versus* volume cresce quando há uma redução do volume da nanopartícula. Quando reduzimos o tamanho da partícula, há um aumento da razão da área superficial e os defeitos de superfície da nanopartícula passam a ser mais significativos e a influenciar mais nas suas propriedades. Esses defeitos nos QDs são devido a ligações não compartilhadas dos átomos de sua superfície e contribuem para a diminuição da eficiência e qualidade da emissão de luz pelos nanocristais. Esse fato leva à formação de níveis intermediários de energia, e quando o elétron vai então da BC para a BV vai perdendo energia aos poucos, pois vai retornando à BV por esses níveis intermediários, ao invés de ir diretamente da BC para a BV (Figura 6) e com isso o espectro de emissão passa a ser mais fraco e mais alargado. Uma solução para essa situação é crescer uma camada de passivação ao redor da nanopartícula (“casca”) para completar as ligações não compartilhadas do núcleo, e usualmente com um semicondutor de maior *band gap*. Por exemplo, se o núcleo é de CdSe, a casca poderá ser de ZnSe ou CdS.

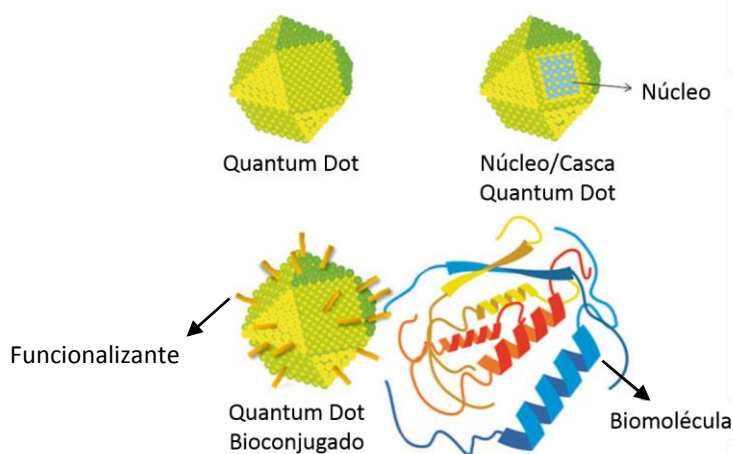
Figura 6 - Efeito da passivação na superfície dos QDs.



Fonte: MATOS (2013).

Os QDs passivados, isto é, que sofreram o processo de passivação, ficam com uma estrutura final tipo *core/shell* (núcleo/casca, Figura 7), e irão apresentar não só uma emissão mais intensa como também um espectro de fluorescência mais estreito (com largura a meia altura – FWHM – em torno de 40 a 50 nm) (SANTOS et al., 2008). O núcleo do nanocrystal determina então em qual comprimento de onda será a emissão. A camada de passivação determina sua fotoestabilidade, a intensidade e qualidade de emissão pela eliminação dos defeitos de superfície. A camada orgânica na superfície (estabilizante e funcionalizante) determinará o grau de funcionalidade biológica, relativas à marcação do sistema biológico de interesse e também a estabilidade do sistema.

Figura 7 - Estrutura de um QD fluorescente conjugado a uma biomolécula.



Fonte: Adaptado de CESAR (2014).

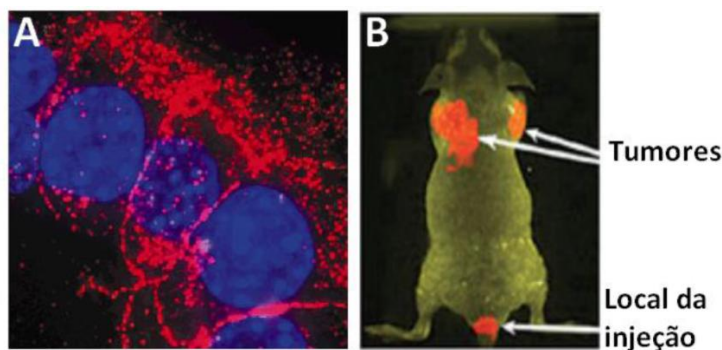
A síntese dos QDs é feita geralmente pela metodologia *bottom-up* ou química coloidal que é baseada numa reação de precipitação controlada feita em solventes orgânicos ou água. A síntese utilizando água, é mais vantajosa para o propósito deste trabalho, pois os QDs são hidrofílicos e mais biocompatíveis, não sendo necessário qualquer procedimento opcional para transformar QDs hidrofóbicos em hidrofílicos. Os QDs hidrofílicos são geralmente formados por elementos dos grupos IIB e VIA da antiga tabela periódica. Os QDs podem ser de CdTe (telureto de cádmio), CdSe (seleneto de cádmio) e ZnSe (seleneto de zinco), entre outros, onde o mais empregado é o CdTe passivado por uma camada de CdS (sulfeto de cádmio).

O QD funcionalizado apenas com o agente estabilizante (que pode ser cisteamina, ácido mercapto-propionico, ácido mercaptosuccínico, entre outros) não é capaz, ainda, de reconhecer um determinado alvo biológico com alta especificidade, para tanto funcionalizações mais complexas com proteínas e ácidos nucleicos podem ser feitas, a esse processo chamamos bioconjugação. Grupamentos disponíveis para fazer a bioconjugação com biomoléculas estão presentes nos agentes estabilizantes/funcionalizantes presentes na superfície dos QDs. Em geral os

estabilizantes/funcionalizantes disponibilizam um radical carboxílico ou um radical amina para bioconjugação. Os QDs aminados, por exemplo, os de cisteamina, são positivamente carregados e os carboxilados, por exemplo, com ácido mercaptopropiônico ou ácido mercaptosuccínico, são negativamente carregados (MEDINTZ et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

A aplicação de QDs hidrofílicos se iniciou através de interações não específicas com o sistema biológico, naquele momento os pesquisadores estavam mais interessados em observar como seriam as propriedades ópticas dos QDs associadas ao sistema biológico e como seria essa interação (BIJU et al. 2010; FARIAS et al., 2006). As marcações biológicas feitas em sítios celulares específicos, tornaram-se mais frequentes quando as bioconjugações começaram a ser mais intensamente estudadas. Um dos primeiros relatos é de autoria de Gao (GAO et al., 2004), quando mostraram que os QDs eram capazes de detectar diferentes marcadores de câncer, em células e tecidos tumorais, especialmente um dos receptores do crescimento epidermóide humano (Her2), conforme Figura 8A.

Figura 8 - (A) O tecido mamário, onde os QDs (vermelhos) se ligam especificamente a receptores Her2. (B) Podemos visualizar os tumores in vivo.



Fonte: Adaptado de GAO et al. (2004).

Para experimentos *in vivo*, os QDs são potencialmente eficientes, principalmente por poderem ser produzidos com emissão no infravermelho, que é uma região na qual os tecidos biológicos apresentam absorção mínima e menor espalhamento, permitindo imagens de maior profundidade. Então pode não haver a necessidade de sacrifício do animal ou de cirurgia para expor o órgão-alvo. Um exemplo de aplicação *in vivo* é apresentado no trabalho de Gao e colaboradores, quando os QDs foram associados a ligantes específicos de receptores em células de câncer de próstata e foi possível observar (Figura 8B) o destino celular final *in vivo* e a localização dos tumores (GAO et al., 2004).

Por se tratarem de nanopartículas sólidas, e serem formados por átomos de elevado número atômico (telúrio, cádmio, selênio, etc.), esses nanocristais possuem a característica de serem eletrodensos, o que é interessante, do ponto de vista biológico. Isso significa que, em microscopia eletrônica de transmissão eles podem ser visualizados (GIEPMANS et al., 2005), uma característica muito vantajosa permitindo a sua localização ultra-estrutural nas amostras.

Devido às propriedades físico-químicas dos QDs, como tamanho, grupos funcionais e carga da superfície, quando incubados com células vivas estes podem: (1) interagir com a membrana de forma específica ou não específica e (2) serem internalizados através de endocitose, o que confinará os QDs em vesículas impedindo sua aplicação para marcação de compartimentos intracelulares específicos. Dessa forma seria interessante, por exemplo, que pudéssemos encapsular os QDs dentro de um veículo capaz de levá-los até o interior da célula, como o lipossoma (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Uma vantagem de se ter os QDs, principalmente bioconjugados, no citoplasma de uma célula é que, podemos estudar com maior clareza os processos intracelulares como o tráfego de moléculas, a interação entre proteínas, eventos como a transcrição e tradução. Processos como esses em geral são descritos usando QDs com sistemas biológicos fixados, uma vez que é difícil a veiculação dos QDs para o citosol de células vivas. Os trabalhos acima referenciados têm em comum o fato do alvo estar fora das células (receptores) e não no interior destas (BREGER, DELEHANTY e MEDINTZ, 2014).

2. MÉTODOS DE ENTREGA INTRACELULAR DE QDs

Para podermos estudar eventos intracelulares utilizando QDs, precisamos, inevitavelmente, direcioná-los ao citoplasma de células vivas em quantidade razoável para que possamos acompanhar tais eventos. Idealmente, os QDs devem estar dispersos como partículas individuais e não aglomerados, para que possamos aproveitar todas as suas vantagens. É preciso também que suas propriedades ópticas sejam mantidas e que não se tornem tóxicos no processo. Dessa forma podemos utilizá-los ao máximo como sondas fluorescentes, *in vitro* ou *in vivo*, nos mais diversos eventos biológicos (BREGER, DELEHANTY e MEDINTZ, 2014).

A entrega (*delivery*) de QDs no citosol da célula pode ser didaticamente esquematizado em três situações, entrega passiva (1), entrega facilitada (2) e a entrega ativa (3), (BREGER, DELEHANTY e MEDINTZ, 2014). Nas primeiras duas situações o destino final dos QDs é estar confinado dentro de endossomas, somente na entrega ativa os QDs estariam livres no citosol. A entrega ativa de QDs livres no citoplasma ainda representa um grande dilema na biologia celular, onde mecanismos funcionais de entrega homogênea citoplasmática são requeridos, além do escape de quaisquer confinamento endossomal e/ou lisossomal (BREGER, DELEHANTY e MEDINTZ, 2014).

A membrana plasmática é uma barreira natural à entrega intracelular de nanomateriais, então os métodos de entrega se baseiam na perturbação dessa membrana para que o material possa entrar na célula. Algumas metodologias de entrega intracelular estão descritas na Tabela 1 e ilustradas na Figura 9, onde se destacam a eletroporação, microinjeção, e os lipossomas fusogênicos como vias de entrega ativa.

Tabela 1 - Métodos para entrega de QDs em células vivas.

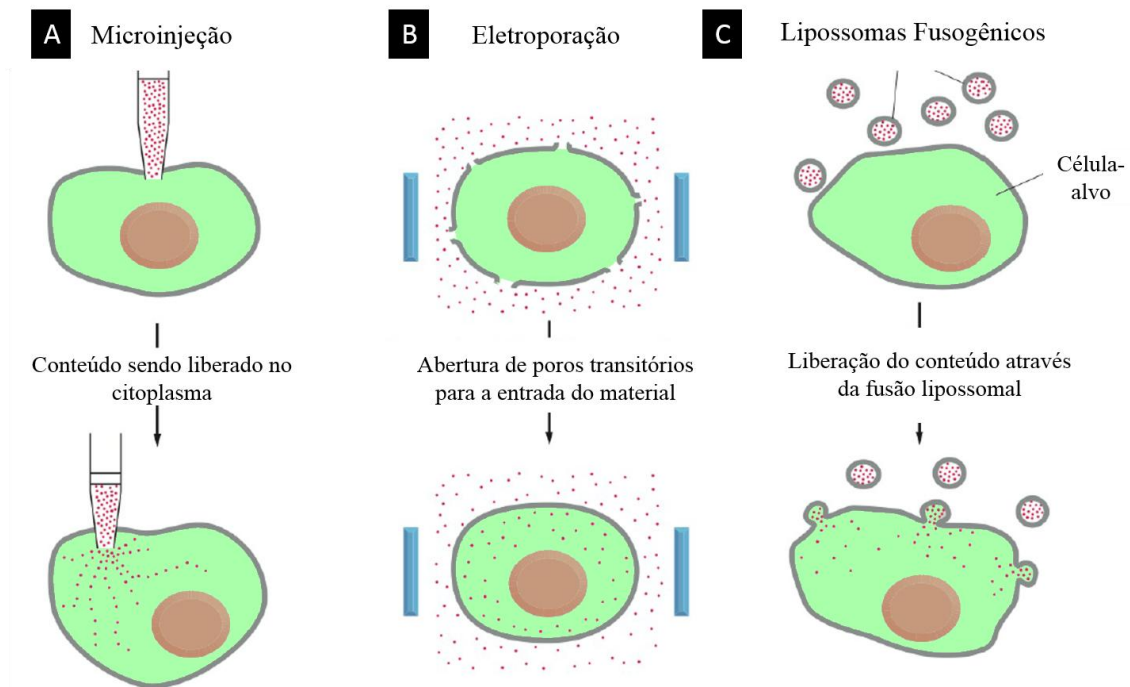
Método	Mecanismo	Vantagens	Desvantagens
Eletroporação	Formação de poros na membrana da célula após aplicação de pulso(s) elétrico(s).	Altamente eficiente.	Efeitos tóxicos significativamente altos.
Microinjeção	Injeção de materiais diretamente na célula por micropipetas.	Quantidades precisas podem ser veiculadas. O direcionamento celular pode ser controlado.	Trabalhosa, com injeção em um número limitado de células.
Lipossomas Fusogênicos	Entrega de materiais encapsulados no core aquoso e/ou na membrana lipossomal.	Controle dos mecanismos de interação com o alvo.	Geralmente associada à liberação endosomal do material encapsulado ou adsorvido.

Fonte: Adaptado de LIRA (2011).

Pela eletroporação são abertos poros transitórios nas membranas devido à descarga elétrica nas células, permitindo a passagem dos QDs para o interior das células (Figura 9B). Em 2004 foi demonstrado por Derfus et al., que a eletroporação é um eficiente método de entrega de QDs em células vivas, porém elas não eram entregues livres (dispersas) e sim em aglomerados (Figura 10A) (DERFUS et al., 2004).

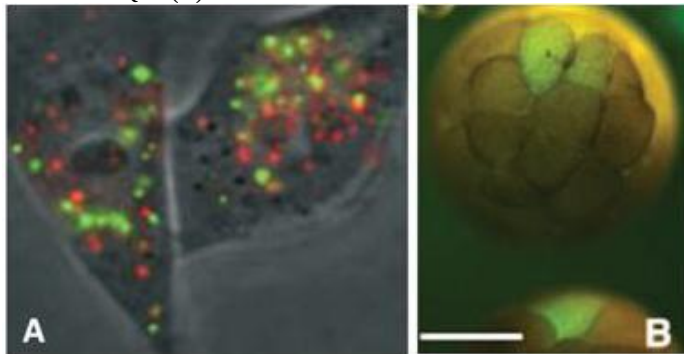
A injeção de QDs com auxílio de micropipeta é uma alternativa a esse método, permitindo a entrega de quantidades precisas de QDs (Figura 9A). Durbertret et al. estudou o desenvolvimento embrionário em *Xenopus sp.* (DUBERTRET et al., 2002), através da injeção de QDs em uma célula dos embriões, e o seu desenvolvimento foi acompanhado nos tecidos derivados dessa célula microinjetada (Figura 10B). Contudo essa técnica é serial, onde é injetada em uma célula por vez, restringe a quantidade de células a ser manipulada, é trabalhosa e requer um operador qualificado.

Figura 9 - Métodos para introduzir nanomaterial no citoplasma, (A) microinjeção, (B) eletroporação e (C) lipossomas fusogênicos.



Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. (2010).

Figura 10 - Entrega dos aglomerados de QDs (A) e a fluorescência de uma única célula do embrião de *Xenopus sp* (B).



Fonte: (A) DERFUS et al. (2004), (B) DUBERTRET et al. (2002).

Para superar as desvantagens dos métodos descritos de entrega (eletroporação lesa a membrana e tem efeitos tóxicos elevados, a microinjeção é cara e trabalhosa) é necessário o desenvolvimento de um veículo capaz de transportar compostos impermeantes às membranas para o interior de células vivas sem danos, de forma eficiente e segura para qualquer tipo celular (universal). Os lipossomas são capazes de carrear peptídeos, drogas e outros tipos de moléculas para dentro das células vivas. Segundo Pinaud, o desenvolvimento de novos métodos para entrega homogênea de QDs no citoplasma celular serão de grande valor para a Ciência (PINAUD et al. 2005). Assim, devido à sua versatilidade, composição,

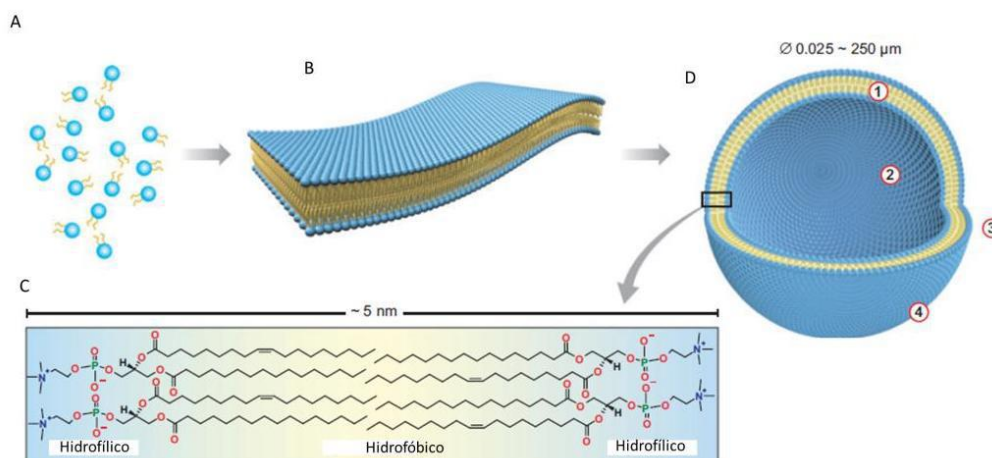
morfologia e capacidade de carrear diversos materiais os lipossomas começaram a ser estudados para carrear QDs.

3. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios, que se formam espontaneamente em água (VALENZUELA, 2007). Por serem estruturas fechadas, é então delimitado um espaço interno, que pode ser utilizado para encapsulamento de diferentes materiais e consequente carregamento destes em várias situações.

A vesícula lipossomal é constituída de dois ambientes de solubilidades diferentes, um hidrofóbico e um hidrofílico (Figura 11D números 1 e 2 respectivamente), isto é devido à natureza anfipática dos fosfolipídios que possuem uma cabeça polar e uma cauda apolar que se organizam em água de modo a ‘proteger’ as caudas apolares, deixando assim a parte polar em contato com o meio aquoso no qual estão inseridos (VALENZUELA, 2007).

Figura 11 - (A) Fosfolipídeos; (B) Bicamada lipídica; (C) Detalhe das moléculas fosfolípídicas e seu arranjo como bicamada; e, (D) Lipossoma.

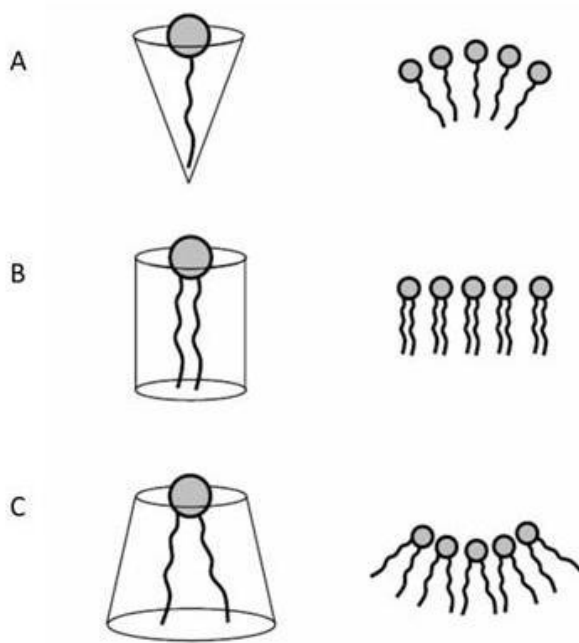


Fonte: Adaptado de JESORKA e ORWAR (2008).

Dentre as possibilidades de carregamento de material pelo lipossoma, além do encapsulamento no centro aquoso de materiais hidrofílicos, é possível também o carregamento na bicamada de materiais hidrofóbicos, e por fim conjugadas à parte externa da bicamada variadas formulações podem ser carregadas (Figura 11D número 4). Estão disponíveis comercialmente uma grande variedade de lipídeos, como o DOTAP que possui carga positiva e os lipídeos associados a corantes fluorescentes como o DPPE-Rh. Novas propriedades são conferidas aos lipossomas quando se tem a presença de lipídeos modificados (presença de carga elétrica ou grupamento fluorescente, ser sensível às variações de temperatura ou pH, além da possibilidade de ligar-se a um alvo específico).

O tamanho da cadeia/cauda e o número de insaturações dos lipídeos mais comuns podem alterar bastante as propriedades dos lipossomas, pois a uma dada temperatura essas características determinarão, por exemplo, o estado de fluidez da membrana. A presença de determinadas moléculas, como o colesterol é capaz de modular as características do lipossoma (VEATCH e KELLER, 2002), diminuindo sua deformabilidade por exemplo. Dependendo da geometria das moléculas dos lipídeos, estes se arranjam diferentemente na bicamada (CHESNOY et. al, 2000), podendo originar lipossomas com morfologias diferentes, essas moléculas podem ser cilíndricas, cônicas, cônico inverso, entre outras (Figura 12).

Figura 12 - Esquema da geometria das moléculas anfifílicas. (A) Lipídeos tipo cone. (B) Geometria cilíndrica. (C) Estruturas com curvatura inversa são formadas.



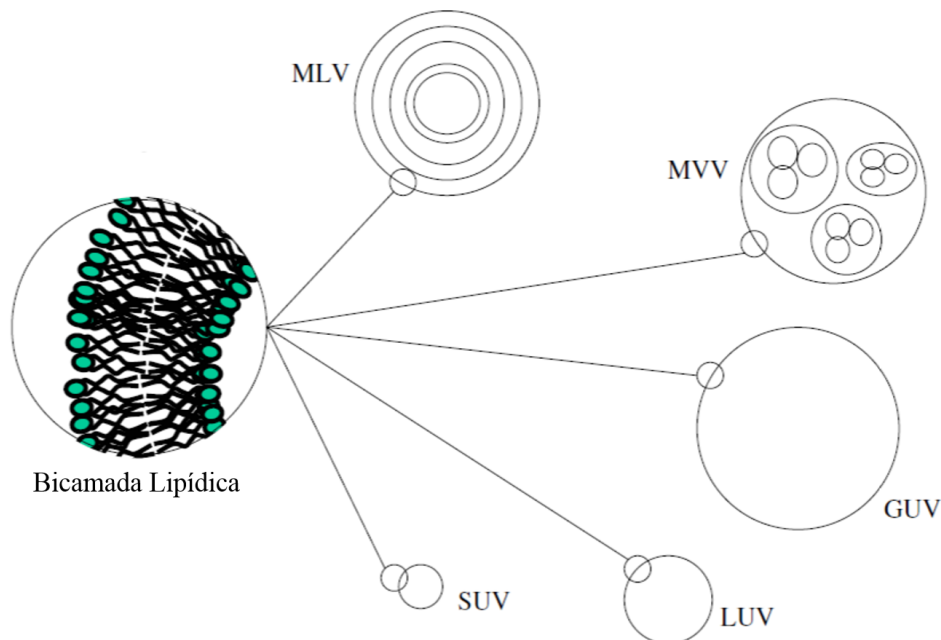
Fonte: Adaptado de WASUNGU e HOEKSTRA (2006).

A depender da quantidade dos lipídeos constituintes (razão molar), a bicamada terá propriedades físicas distintas. Fosfatidilcolina (PC) é uma molécula cilíndrica (Figura 12B), Fosfatidiletanolamina (PE) um lipídeo cônico inverso (Figura 12C), e pode ser usado para desestabilizar membranas, pois quando há grande quantidade deste pode haver uma mudança da fase lamelar (bicamada) para a estrutura de curvatura inversa, este é um lipídeo auxiliar (*helper lipid*) (WASUNGU e HOEKSTRA, 2006).

As propriedades dos lipossomas são definidas pelos seus componentes, portanto a escolha destes norteará sua função, por exemplo, os positivamente carregados contendo DOTAP terão uma facilidade em se ligar às membranas celulares, após a endocitose de vesículas contendo lipídeos PE há maior tendência de desestabilização de membranas e liberação de materiais (DNA, por exemplo).

Lipossomas podem ser divididos morfologicamente em alguns tipos: Vesículas pequenas unilamelares (*SUVs*) de tamanho entre 20 e 200 nm; grandes unilamelares (*LUVs*) variando entre 200 a 1000 nm; multilamelares (*MLVs*); multivesiculares (*MVVs*) e gigantes unilamelares (*GUVs*) a partir de 10 μm , das siglas em inglês (Figura 13). Esses tamanhos variam na literatura, mas geralmente está compreendida nesses intervalos, porém o tamanho dos multilamelares e oligolamelares é bastante diversificado e é usualmente classificado pelo número de lamelas/bicamadas (TRESSET et al., 2009).

Figura 13 - Representação da bicamada lipídica e dos tipos de lipossomas quanto a suas diferenças morfológicas.



Fonte: Adaptado de GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO et al. (2005).

São várias as formas de produzir lipossomas, ou seja, há várias metodologias descritas e geralmente as mais tradicionais irão formar *MLVs*. Pela hidratação de um filme lipídico, formado no fundo de um recipiente logo após a evaporação do solvente no qual os lipídeos estavam dispersos, há a formação de lipossomas (WALDE e ICHIKAWA 2001). Vigorosa agitação da solução de hidratação implicará na formação de vesículas com variada lamelaridade e distribuição de tamanho. Técnicas como, e não somente, a homogeneização à alta pressão, injeção de etanol, evaporação de fase reversa, diálise lenta, são utilizadas para o preparo dos lipossomas com distintas características morfológicas resultantes. Não acho que precise explicar cada uma delas (WALDE e ICHIKAWA, 2001; RIAZ, 1996; WAGNER e VOUREAUER-UHL, 2010).

A entrega de compostos bioativos por lipossomas é muito vantajosa, visto sua capacidade de encapsulá-los. Dependendo do material a ser encapsulado, suas características de solubilidade é que irão dizer em que etapa do preparo lipossomal o vamos inserir. Se esse for hidrofóbico deverá ser colocado

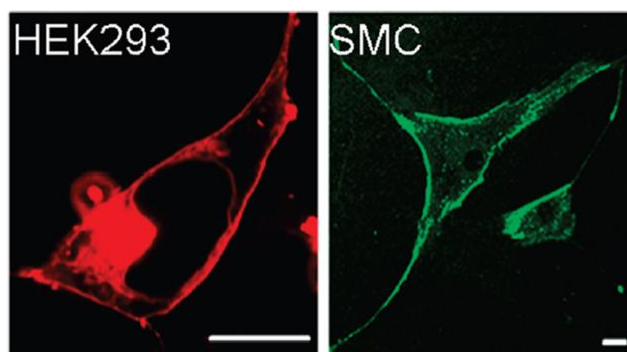
juntamente com os lipídeos na solução orgânica a ser evaporada, considerando como modelo de preparo a hidratação de filme lipídico. Então a molécula fará parte do filme lipídico e conseqüentemente da bicamada. Se for hidrofílico devemos então inseri-lo na solução de hidratação (SZOKA JR. e PAPAHAADJOPOULOS, 1980).

Técnicas de redução de tamanho/número de lamelas foram desenvolvidas para adequar as vesículas às mais diferentes aplicações, dentre as principais técnicas está a extrusão (onde a suspensão de MLVs é forçada contra uma membrana de poros com tamanhos definidos). Outra técnica é a agitação mecânica (utilizando ultrassom) que rompe as lamelas dos MLVs formando vesículas de tamanho reduzido (WALDE e ICHIKAWA 2001). Essas duas metodologias formam lipossomas menores, geralmente unilamelares ou oligolamelares (SZOKA JR. e PAPAHAADJOPOULOS, 1980).

Ciclos de congelamento e descongelamento também são usados para diminuir o tamanho dos MLVs e também é um método de escolha para aumentar a eficiência da encapsulação de substâncias hidrossolúveis, dando lugar a vesículas oligolamelares mais homogêneas e consideravelmente menores (WALDE e ICHIKAWA 2001). Quando as vesículas são congeladas, ocorrem rachaduras em suas bicamadas (causadas pela expansão do volume de água), e quando descongeladas, elas têm que se reorganizar rapidamente, o que diminui sub sequencialmente seu tamanho, quanto mais ciclos, menor o tamanho e mais simples a morfologia(WALDE e ICHIKAWA 2001).

Em 2010, Csiszár e colaboradores descreveram composições lipossomais fusogênicas, contendo corantes orgânicos (grupos aromáticos) como uma das peças fundamentais para que sejam fusogênicos. Lipossomas compostos de DOPE, DOTAP e o lipídeo ligado à um grupo aromático (1:1:0,1 de proporção molar), foram testadas com diferentes linhagens celulares, por fim foi avaliada a eficiência de fusão para cada grupo aromático diferente (CSISZÁR et al. 2010). A mistura de um lipídeo neutro (DOPE), de um positivo (DOTAP) e um ligado a um grupo aromático mostrou-se extremamente efetiva quanto à fusão celular. O lipossoma formado apenas de DOPE e DOTAP não apresentou propriedades fusogênicas. Uma das vantagens apresentadas pela adição do componente fluorescente é a possibilidade de se visualizar e portanto acompanhar o processo de fusão ao longo do tempo, acompanhando modificações/crescimento celular (Figura 14) (CSISZÁR et al. 2010).

Figura 14 - Membranas celulares de HEK293 e células musculares lisas marcadas pelos lipossomas fusogênicos contendo Rodamina B e BODIPY FL-DHPE, vermelho e verde respectivamente. Barras: 10 µm.



Fonte: Modificado de CSISZÁR et al. (2010).

Foram testados 11 lipídeos ligados à grupos aromáticos (LA), onde as proporções foram mais efetivas quando se usou entre 0,2 e 0,05 de LA para DOTAP e DOPE, sempre em relação de 1:1. Deve-se atentar que baixas concentrações do LA não promove uma fusão eficiente enquanto grandes quantidades podem ser tóxicas às células (CSISZÁR et al. 2010). Todos esses 11 lipossomas mostraram-se fusogênicos, porém em diferentes níveis de eficiência, analisando-se o tempo de fusão e a homogeneidade da fluorescência na membrana celular. Mais da metade teve a eficiência de fusão classificada como muito boa, dentre esses o DOPE-Rh⁴, TR-DHPE⁵, β -BODIPY-C₁₂HPC⁶, β -BODIPY-C₅-HPC⁷, BODIPY FL-DHPE⁸, DiO⁹ e o TMR-DHPE¹⁰ (CSISZÁR et al. 2010).

Essa composição padrão abre uma série de possibilidades para marcação (Figura 15), adicionando-se proteínas transmembranares ou lipídeos funcionalizados no lipossoma pode-se conseguir a transferência destes para a membrana celular. O carregamento de materiais hidrofílicos no *core* (QDs por exemplo) também pode ser feito através desse lipossoma (CSISZÁR et al. 2010). Esses lipossomas fusogênicos podem ser facilmente adaptados para diferentes propósitos, como por exemplo, ao direcionamento específico às células cancerígenas, podendo ser utilizado para fins médicos, visto sua capacidade de carrear material encapsulado. As possibilidades nanobiotecnológicas de aplicações são bem variadas, podendo adaptar o lipossoma a cada aplicação desejada (CSISZÁR et al. 2010).

Figura 15 - Variedade de aplicações dos lipossomas fusogênicos dependendo de sua composição. (A) Visualização da membrana plasmática, (B) incorporação de proteína transmembrana na membrana celular, (C) funcionalização da superfície celular, e (D) entrega de material no citoplasma.

⁴ 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(lisamina rodamina B sulfonil).

⁵ Vermelho Texas 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

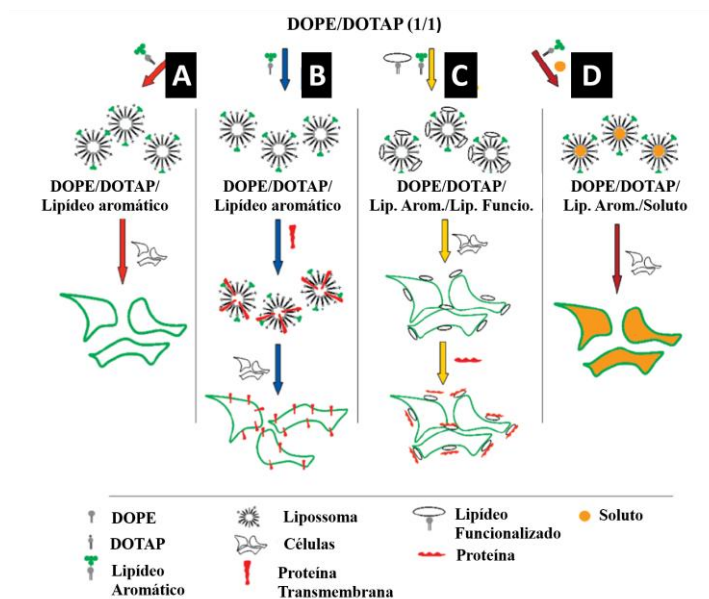
⁶ 2-(4,4-difluoro-5-metil-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-3-dodecanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

⁷ 2-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4adiazas-indacene-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.

⁸ *N*-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diazas-indacene-3-propionil)-1,2-dihexadecanoil sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

⁹ DiOC18(3)3,3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato.

¹⁰ *N*-(6-tetrametilrodaminatiocarbamoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.



Fonte: Modificado de CSISZÁR et al. (2010).

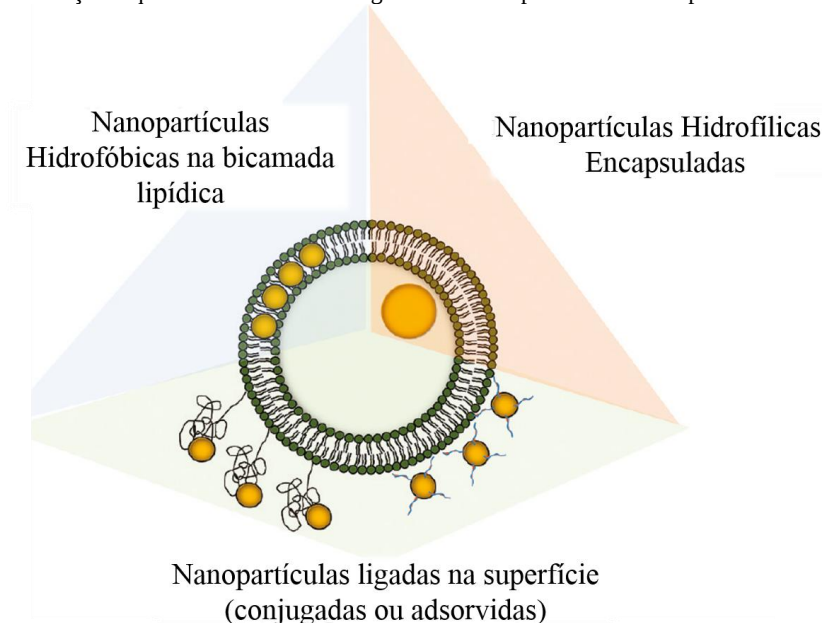
4. ENCAPSULAÇÃO DE QDS EM LIPOSSOMAS

A encapsulação de materiais como genes, drogas (antifúngicas e citotóxicas) e nanopartículas em lipossomas vêm sendo bem estudada ao longo dos anos, mostrando que a entrega de nanomateriais veiculados através de lipossomas tem grande potencial. No entanto, a utilização de QDs para o estudo intracelular ainda é uma questão que necessita ser bem elucidada (BREGER, DELEHANTY e MEDINTZ 2014).

Esquemáticamente existem duas formas básicas de entrega de nanomateriais através dos lipossomas, (1) mediada por endocitose onde há o confinamento no endossoma e depois uma liberação para o citosol, e (2) a fusão direta do lipossoma à membrana celular onde não há aprisionamento no endossoma (PAGANO e WEINSTEIN 1978). Todavia, fusão e endocitose não são mutuamente exclusivas, podendo ocorrer as duas ao mesmo tempo em graus diferentes, dependendo também do tipo celular estudado e da temperatura de trabalho, pois é conhecido que à baixa temperatura (4-10 °C) a endocitose é interrompida (MAHATO, ROLLAND, e TOMLINSON 1997).

Os QDs existem em variados tipos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, positivos ou negativos, bioconjugados ou não, e nos lipossomas, as nanopartículas hidrofóbicas são incorporadas na bicamada lipídica, as hidrofílicas encapsuladas no núcleo aquoso, e nanopartículas ligadas na superfície podem ser conjugadas quimicamente ou fisicamente adsorvidas (Figura 16). Dessa forma, existe uma infinidade de possibilidades de formulações lipossomais contendo QDs.

Figura 16 - Representação esquemática de três abordagens diferentes para carrear nanopartículas em lipossomas.



Fonte: Adaptado de AL-JAMAL e KOSTARELOS (2011).

O preparo lipossomal contendo nanopartículas pode ser feito por diferentes metodologias dentre elas, a técnica de diálise em detergente, evaporação de fase reversa, injeção de etanol, e a mais comumente utilizada é a hidratação de filme lipídico (WHEELER et al. 1999, TURANEK et al. 2003, BATZRI e KORN, 1973, WALDE e ICHIKAWA 2001). Até onde sabemos, utilizando a técnica de injeção de etanol, foi apenas reportado um trabalho sobre encapsulação com QDs hidrofóbicos (MUTHU et al. 2012). Aliado à versatilidade desses sistemas, abre-se o leque para variadas abordagens em linhagens celulares diversas, onde poderiam ser marcadas estruturas, biomoléculas e rotas intracelulares.

Inicialmente (nos lipossomas) eram mais comumente utilizados os QDs hidrofóbicos, por sua facilidade de incorporação na membrana lipossomal, pelas diversas técnicas de produção e a possibilidade de se utilizar vários lipídeos diferentes sendo produzidos controladamente em cada técnica escolhida (GOPALAKRISHNAN et al. 2006). Gopalakrishnan e colaboradores formularam dois lipossomas diferentes com QDs hidrofóbicos (CdSe) e avaliaram o seu comportamento quando incubadas com células de rim embrionário humano (HEK293), interessante uma das composições era preferencialmente endocitada (Figura 17 – A) enquanto a outra fundia-se à membrana celular (Figura 17 – B).

O lipossoma que foi endocitado tinha 25% de DOTAP e 75% de DMPC¹¹, e o que fundiu 25% de DOTAP, 74,5% de DMPC e 0,5% de DPPE-PEG2000¹². Essa pequena adição ao lipossoma promoveu

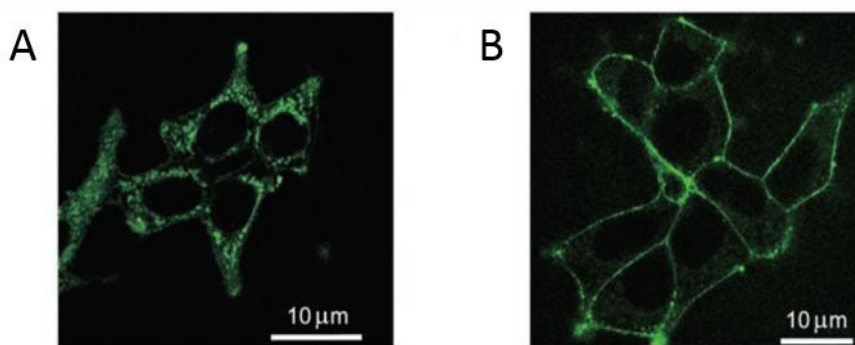
¹¹ 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.

¹² 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamine-N-[metoxi(polietileno glicol 2000)].

um resultado totalmente diferente, onde o mecanismo não é totalmente compreendido mas acredita-se que o PEG atue como uma barreira entre o lipossoma positivo e a membrana celular negativa, prevenindo sua internalização. Assim, há uma vulnerabilidade na membrana, onde os lipídeos PE e o QD disparam a fusão entre as membranas (GOPALAKRISHNAN et al. 2006).

Esse trabalho ampliou os horizontes quanto à utilização de QDs e outras nanopartículas em lipossomas, o que os torna mais biocompatíveis e assim menos citotóxicos, todavia não libere os QDs livres no citosol é importante destacar que está dentre os pioneiros a estudar QDs e lipossomas em marcação de células vivas, apesar de se tratar de QDs hidrofóbicos (GOPALAKRISHNAN et al. 2006).

Figura 17 - Interação dos lipossomas com células HEK293, (A) internalização dos lipossomas sem PEG, e (B) fusão dos lipossomas contendo PEG.



Fonte: Adaptado de GOPALAKRISHNAN et al. (2006).

Um dos relatos sobre encapsulamento de QDs em lipossomas para marcar livremente estruturas presentes no citosol aborda o uso de lipossomas catiônicos contendo QDs comerciais hidrofílicos bioconjugados à estreptavidina em células progenitoras gliais e de adenocarcinoma cervical humano - HeLa (DUDU et al. 2008) (Figura 18). Foram utilizados três lipídeos em duas composições diferentes, o lipídeo positivo utilizado foi o DOPC¹³ presente nas duas composições, o OPPC¹⁴ para o catiônico e o NDB-PC¹⁵ para o lipossoma catiônico fluorescente, proporção molar de 1:1 nas duas composições.

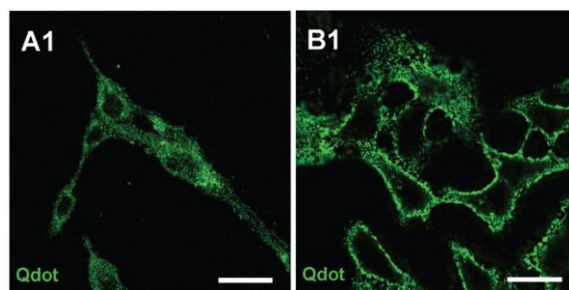
A encapsulação foi feita através do método de hidratação de filme fino de lipídeos com uma suspensão de QDs, vortexado por 4 minutos, congelado e descongelado 3 vezes e então extrudado em membranas de polycarbonato de diâmetro de poro em 200 nm.

Figura 18 - Entrega de QDs através de lipossomas em células progenitoras gliais (A1) e em células HeLa (B1). Barras: 20 µm.

¹³ 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina.

¹⁴ 1-oleoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

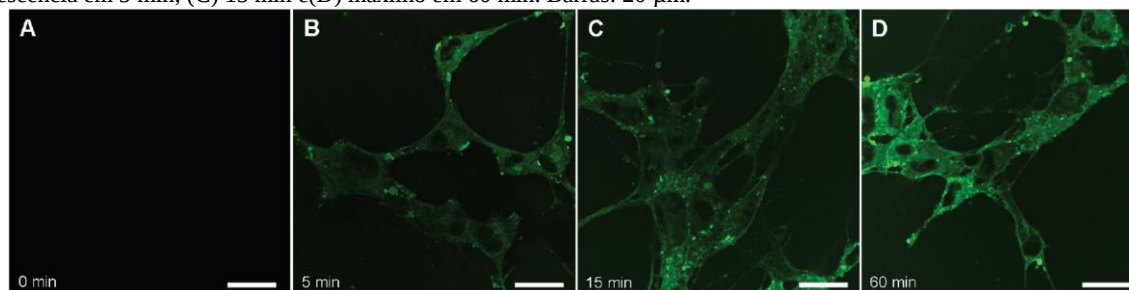
¹⁵ 1-oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfocolina.



Fonte: DUDU et al. (2008).

A presença de aglomerados de QDs no interior das células, foi explicada pela concentração dos mesmos durante o preparo lipossomal, onde é proposta a utilização de uma concentração ideal para diminuir esse efeito. Um ponto chave seria a fusão de lipossomas com as células, a qual ocorre rapidamente, onde em 5 minutos já é possível visualizar sinal de fluorescência do lipídeo PC ligado ao corante NDB (verde), Figura 19. Todavia tenha realizado marcação celular com QDs através de lipossomas catiônicos esta marcação foi limitada, pois foi relatado que houve predominantemente endocitose à fusão. Em uma marcação com células progenitoras gliais utilizando uma formulação catiônica, POPC¹⁶ e DOTAP com ou sem colesterol, então não foi demonstrada e entrega livre de QDs (DUDU et al. 2008).

Figura 19 - Escala de tempo de fusão de lipossoma fluorescente com células progenitoras gliais, nenhum sinal em (A) 0 min, (B) fluorescência em 5 min, (C) 15 min e (D) máximo em 60 min. Barras: 20 µm.



Fonte: DUDU et al. (2008).

Em 2009, Yang e colaboradores encapsularam QDs hidrofílicos de CdTe funcionalizados com AMP (fluorescentes no amarelo) em lipossomas não fusogênicos, contendo ou não um receptor de folato na membrana, e avaliaram seu uso como sondas fluorescentes em células vivas (YANG et al. 2009). Os lipídeos utilizados no lipossoma não marcado foram HSPC¹⁷, colesterol, mPEG-DSPE¹⁸ e no lipossoma marcado com o receptor de folato HSPC, colesterol, mPEG-DSPE, Folato-PEG-CHEMS¹⁹.

¹⁶ 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.

¹⁷ Fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

¹⁸ Monometoxi de polietileno glicol 2000-diestearoil-fosfatidiletanolamina.

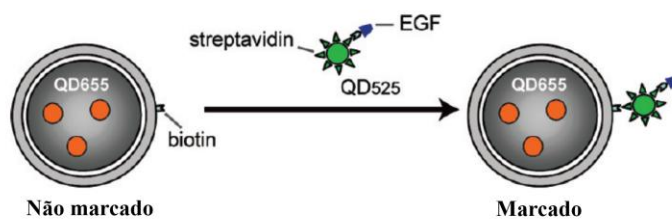
¹⁹ Folato-PEG-hemissuccinato de colesterol.

O preparo dos lipossomas foi feito a partir da hidratação de filme lipídico com uma suspensão de QDs, e depois extrudado em membranas de polycarbonato em 220 nm. Yang propõe a hipótese que o encapsulamento de QDs em lipossomas pode aumentar o rendimento quântico e estabilidade, diminuindo também a citotoxicidade dos QDs. Em seus experimentos ele confirmou que os lipossomas contendo QDs diminuíram a taxa de apoptose de células HeLa quando comparado aos QDs livres (YANG et al. 2009). A marcação nas células HeLa foi feita através de endocitose mediada pelos receptores de folato.

QDs comerciais hidrofílicos (CdSe/ZnS com emissão no vermelho) foram direcionados ao citoplasma de linhagens celulares oncogênicas, mediado por internalização lipossomal, através da ligação específica do fator de crescimento epidermóide humano (EGF) presente na bicamada lipídica do lipossoma, ao seu receptor (EGFR) expresso pelas células oncogênicas (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Os lipossomas foram feitos pelo método de diálise de detergente, utilizando os lipídeos DOPE, DOTAP e DSPE²⁰ ligado à biotina, o que permitiu a utilização de outro QD ancorado à bicamada, este com emissão no verde e bioconjugado à EGF, através da ligação biotina-estreptavidina, dessa forma um complexo sistema de entrega específico foi montado (Figura 20) (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Figura 20 - Esquema dos lipossomas encapsulando QDs (vermelho), e a ligação via biotina-estreptavidina aos QDs (verde) ligados ao EGF.



Fonte: Modificado de SIGOT ARNDT-JOVIN e JOVIN (2010).

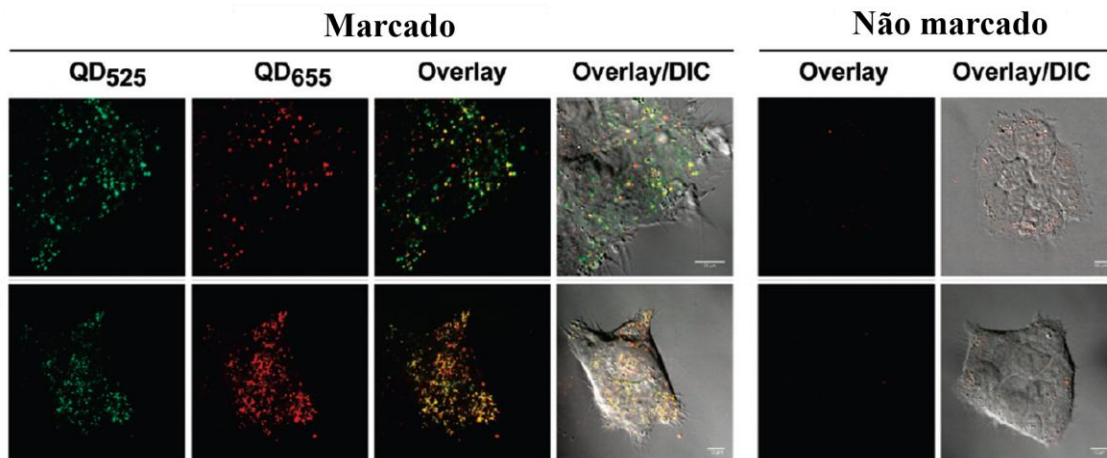
Sigot e colaboradores utilizaram três linhagens celulares para provar a marcação específica do lipossoma apenas nas células que expressam o receptor do EGF. Apenas em células do carcinoma epidermóide humano que expressam o EGFR vemos claramente que somente os lipossomas que possuíam o QD verde, e portanto o EGF, foram internalizadas e quase nenhum sinal de fluorescência foi observado quando o lipossoma não marcado foi incubado com as células (Figura 21) (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Em células de ovário de hamster Chinês e em células de melanoma não foi evidenciado nenhuma marcação proveniente dos lipossomas marcados com EGF. A estratégia do uso de uma dupla marcação com QDs nos lipossomas foi uma forma de acompanhar tanto a entrega do QD ao citoplasma e o destino

²⁰ 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina.

do lipossoma, pela localização das fluorescências feito através de microscopia confocal (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Figura 21 - Marcação celular dos lipossomas marcados e não marcados.



Fonte: Modificado de SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN (2010).

Diferentemente do esperado, o sinal de co-localização persistiu por 12 horas após a incubação, indicando que não houve liberação de QDs livres no citosol. Isso pode ser resultado de uma agregação dos QDs carboxilados no ambiente ácido dos endossomas e que não escaparam para o citoplasma, continuando próximos às membranas lipossomais, gerando o sinal de co-localização (SIGOT, ARNDT-JOVIN e JOVIN, 2010).

Esses resultados apresentados apontam que essas formulações lipossomais são uma grande promessa para a entrega de QDs e outras nanopartículas, especialmente a de Csiszár (CSISZÁR et al. 2010). Foram encontrados poucos trabalhos referenciando o encapsulamento de QDs em lipossomas para o estudo intracelular, ± 20 em uma janela de 10 anos, o que caracteriza uma lacuna sobre a dinâmica de entrega de QDs em células vivas.

Apesar de todas as investigações feitas com lipossomas contendo QDs, são poucos os métodos propostos para a entrega homogênea de QDs no interior das células, até onde sabemos ainda não foi evidenciada entrega livre no citosol, nenhuma marcação de estruturas intracelulares ou organelas, nem o acompanhamento da dinâmica celular utilizando QDs veiculados por lipossomas. Os lipossomas fusogênicos estudados por Csiszár e colaboradores em 2010 podem ser uma bem-sucedida via de entrega (CSISZÁR et al. 2010).

IV – REFERÊNCIAS

- A. CSISZÁR, N. HERSCH, S. DIELUWEIT, R. BIEHL, R. MERKEL, B. HOFFMANN. Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification. *Bioconjugate Chemistry*. 21, 537–543, 2010.
- A. GÓMEZ-HENS, J. M. FERNÁNDEZ-ROMERO. The role of liposomes in analytical processes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24.1, 9-19, 2005.
- A. JESORKA, O. ORWAR. Liposomes: Technologies and Analytical Applications, *Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 801– 32, 2008.
- A. L. L. MATOS. Lipossomas para Entrega Intracelular de Quantum dots Fluorescentes. Monografia (Graduação em Biomedicina), Universidade Federal de Pernambuco, 1–50, 2013.
- A. M. DERFUS, W. C. W. CHAN, S. N. BATHIA. Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking. *Advanced Materials* 16, n. 12, 961-966, 2004.
- A. WAGNER, K. VORAUER-UHL. Liposome technology for industrial purposes. *Journal of drug delivery*, 2011, 2010.
- B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, P. WALTER. *Biologia Molecular da Célula*, 5.ed, Porto Alegre: Artes Médicas, 2010.
- B. DUBERTRET, P. SKOURIDES, D. J. NORRIS, V. NOIREAUX, A. H. BRIVANLOU, A. LIBCHABER. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science* 298, 1759-1762, 2002.
- B. N. G. GIEPMANS, S. R. ADAMS, M. H. ELLISMAN, R. Y. TSIEN. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* 312, 217 – 224, 2006.
- B. N. G. GIEPMANS, T. J. DEERINCK, B. L. SMARR, Y. Z. JONES, M. H. ELLISMAN. Correlated light and electron microscopy endogenous protein using Quantum dots. *Nature Methods* 2, n. 10, 743-749, 2005.
- B. S. SANTOS, P. M. FARIAS, A. FONTES. “Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications” in *Handbook of Self Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*. Elsevier, Oxford, editado por Mohamed H., 2008.
- C. L. CESAR. “Quantum Dots as Biophotonics Tools” in *Quantum Dots: Applications in biology*, second edition. Springer, New York, editado por Adriana Fontes e Beate S. Santos., 2014.
- C. YANG, N. DING, Y. XU, X. QU, J. ZHANG, C. ZHAO, L. HONG, Y. LU, G. XIANG. Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes. *Journal of Drug Targeting* 17, n.7, 502–511, 2009.

- D. L. NELSON, M. M. COX. Lipids in Lehninger, 4th ed., W. H. Freeman, USA, 343-368, 2004.
- F. PINAUD, X. MICHALET, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. IYER, S. WEISS. Advances in Fluorescence Imaging with Quantum Dot Bio-probes. *Biomaterials* 27, 1679 – 1687, 2005.
- F. SZOKA JR, D. PAPAHAADJOPOULOS. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 9, 467-508, 1980.
- G. GOPALAKRISHNAN, C. DANELON, P. IZEWSKA, M. PRUMMER, P. Y. BOLINGER, I. GEISSBÜHLER, D. DEMURTAS, J. DUBOCHET, H. VOGEL, Multifunctional Lipid/Quantum Dot Hybrid Nanocontainers for Controlled Targeting of Live Cells. *Angewandte Chemie International* 45, 5478 –5483, 2006.
- G. TRESSET. The Multiple Faces of Self-assembled Lipidic Systems. *PMC Biophysics* 2, n. 3, 1-25, 2009.
- I. L. MEDINTZ, H. T. UYEDA, E. R. GOLDMAN, H. MATTOUSSI. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials* 4, 435-446, 2005.
- I. R. MAHATO, A. ROLLAND, E. TOMLINSON. Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research* 14.7, 853-859, 1997.
- J. B. DELEHANTY, H. MATTOUSSI, I. L. MEDINTZ. Delivering Quantum Dots into Cells: Strategies, Progress and Remaining Issues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1091 – 1105, 2008.
- J. BREGER, J. B. DELEHANTY, I. L. MEDINTZ. Continuing progress toward controlled intracellular delivery of semiconductor quantum dots. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 7: 131–151, 2014.
- J. J. WHEELER, L. PALMER, M. OSSANLOU, I. MACLACHLAN, R. W. GRAHAM, Y. P. ZHANG, M. J. HOPE, P. SCHERRER, P. R. CULLIS. Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene therapy* 6, no. 2, 271-281, 1999.
- J. TURÁNEK, A. KAŠNÁ, D. ZÁLUSKÁ, J. NEČA. Preparation of Sterile Liposomes by Proliposome–liposome Method. *Methods in enzymology* 367, 111-125, 2003.
- J. ZHANG, R. E. CAMPBELL, A. Y. TING, R. Y. TSIEN. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 906-918, 2002.
- L. WASUNGU, D. HOEKSTRA. Cationic Lipids, Lipoplexes and Intracellular Delivery of Genes. *Journal of Controlled Release* 116, 255–264, 2006.
- M. BRUCHEZ JR., M. MORONNE, P. GIN, S. WEISS, A. PAUL ALIVISATOS. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science* 281, 2013 – 2016, 1998.
- M. RIAZ. Liposomes Preparation Methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, n. 1, 65-77, 1996.
- M. S. MUTHU, S. A. KULKARNI, A. RAJU, S.FENG. Theranostic Liposomes of TPGS coating for Targeted Co-delivery of Docetaxel and Quantum dots. *Biomaterials* 33, 3494-3501, 2012.

P. M. A. FARIAS, B. S. SANTOS, F. D. MENEZES, R. FERREIRA, A. FONTES, H. F. CARVALHO, L. ROMÃO, V. MOURA-NETO, J. C. O. F. AMARAL, C. L. CESAR, R. C. B. Q. FIGUEIREDO, F. R. B. LORENZATO. Quantum dots as fluorescent bio-labels in cancer diagnostic. *Physica Status Solid. C* 3, n.11, 4001–4008, 2006.

P. WALDE, S. ICHIKAWA. Enzymes inside Lipid Vesicles: Preparation, Reactivity and Applications. *Biomolecular Engineering* 18, 143–177, 2001.

R. B. de LIRA. Estudo da interação de quantum dots com células e direcionamento intracelular mediado por lipossomas. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, CCB, Recife, 110f., 2011.

R. B. LIRA; M. A. B. L. SEABRA; A. L. L. MATOS; J. V. VASCONCELOS; D. P. BEZERRA; C. G. RODRIGUEZ; E. de PAULA; B. S. SANTOS; A. FONTES. Studies on intracellular delivery of carboxyl-coated quantum dots mediated by fusogenic liposomes. *Journal of Materials Chemistry B*, 1:4297-4305, 2013.

R. E. PAGANO, J. N. WEINSTEIN. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annual review of biophysics and bioengineering* 7.1, 435-468, 1978.

S. BATZRI, E. D. KORN. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1015-9, 1973.

S. CHESNOY, L. HUANG. Structure and Function of Lipid-Dna Complexes for Gene Delivery. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 27–47, 2000.

S. L. VEATCH, S. L. KELLER. Organization in Lipid Membranes Containing Cholesterol. *Physical Review Letters* 89, n. 26, 268101-268104, 2002.

S. M. VALENZUELA. Liposome techniques for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes in “Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes”, Springer, New York, USA, 75-87, 2007.

U. RESCH-GENGER, M. GRABOLLE, S. CAVALIERE-JARICOT, R. NITSCHKE, T. NANN. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*, 5(9), 763-775, 2008.

V. BIJU, T. ITOH, M. ISHIKAWA. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chemical Society Review* 39, 3031-3056, 2010.

V. DUDU, M. RAMCHARAN, M. L. GILCHRIST, E. C. HOLLAND, M. VAZQUEZ. “Liposome Delivery of Quantum Dots to the Cytosol of Live Cells”. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8, 2293–2300, 2008.

V. P. TORCHILIN. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 145-160, 2005.

V. SIGOT, D. J. ARNDT-JOVIN, T. M. JOVIN. Targeted Cellular Delivery of Quantum Dots Loaded on and in Biotinylated Liposomes. *Bioconjugate Chemistry* 21, 1465–1472, 2010.

W. C. W. CHAN, S. NIE. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* 281, 2013 – 2016, 1998.

W. T. AL-JAMAL, K. KOSTARELOS. Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*, 1094-104, 2011.

X. GAO, Y. CUI, R. M. LEVENSON, L. W. K. CHUNG, S. NIE. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology* 22, n. 8, 969-976, 2004.

X. MICHALET, F. F. PINAUD, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. SUNDARESAN, A. M. WU, S. S. GAMBHIR, S. WEISS. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* 30, 538 – 544, 2005.

V – ARTIGO PUBLICADO

Artigo publicado na revista *Journal of Materials Chemistry B*.

Studies on intracellular delivery of carboxyl-coated CdTe quantum dots mediated by fusogenic liposomes†

Cite this: DOI: 10.1039/c3tb20245c

Rafael B. Lira,^a Maria A. B. L. Seabra,^b Anna L. L. Matos,^a Jéssica V. Vasconcelos,^a Darlene P. Bezerra,^a Eneida de Paula,^c Beate S. Santos^b and Adriana Fontes^{*a}

The use of Quantum Dots (QDs) as fluorescent probes for understanding biological functions has emerged as an advantageous alternative over application of conventional fluorescent dyes. Intracellular delivery of QDs is currently a specific field of research. When QDs are tracking a specific target in live cells, they are mostly applied for extracellular membrane labeling. In order to study intracellular molecules and structures it is necessary to deliver free QDs into the cell cytosol. In this work, we adapted the freeze and thaw method to encapsulate water dispersed carboxyl-coated CdTe QDs into liposomes of different compositions, including cationic liposomes with fusogenic properties. We showed that labeled liposomes were able to fuse with live human stem cells and red blood cells in an endocytic-independent way. We followed the interactions of liposomes containing QDs with the cells. The results were minutely discussed and showed that QDs were delivered, but they were not freely diffused in the cytosol of those cells. We believe that this approach has the potential to be applied as a general route for encapsulation and delivery of any membrane-impermeant material into living cells.

Received 19th February 2013

Accepted 26th June 2013

DOI: 10.1039/c3tb20245c

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

The use of Quantum Dots (QDs) as fluorescent probes for understanding biological functions has emerged as an advantageous alternative over application of conventional fluorescent dyes.^{1,2} QDs have been used for cellular labeling and biomedical research due to their wide absorption and narrow emission spectra, bright fluorescence, high photostability, chemically active surface and size-tunable emission.^{3–6} These optical properties have allowed long term analysis of biological events and labeling of multiple targets simultaneously for reconstruction of multicolor images.⁷ However, especially for living cells, due to their size and physico-chemical properties, QDs have been mostly applied to label and target structures localized in the extracellular membrane.⁸ Therefore, it is still challenging to study intracellular molecules and organelles using QDs. These nanometer sized crystals cannot passively cross the lipid bilayer of plasma membranes and diffuse freely into the cytosol. QDs are endocytosed and confined in vesicular endosomes, limiting their application in experiments of intracellular labeling. Thus, the development of methods to overcome the

plasma membrane and/or escape from endo/lysosomal trapping after endocytosis is required for these fluorophores.

Some methods have been applied to deliver membrane-impermeant compounds to the cell interior. They can be classified as chemical, biological or physical approaches. Chemical strategies rely basically on the use of nanocarriers chemically designed to deliver materials into cells.^{9,10} Biological methods are almost exclusively mediated by viral vectors^{10–12} whereas physical approaches are based mainly on cell membrane manipulations (i.e. electroporation and microinjection).^{13,14} Some of these strategies have been tested to deliver QDs into cells and combine their own advantages and disadvantages. For instance, in the case of physical approaches, while electroporation is able to overcome the plasma membrane of many cells at a time by producing transient pores, it causes damage to the biological system and delivers QDs as agglomerates.^{15,16} By microinjection, the material can be introduced into any desired cellular compartment in any amount, but this is a laborious cell-by-cell technique and it also requires specialized equipment.^{16–18}

On the other hand, some chemical strategies for delivery of QDs rely on the use of osmotic lyses such as the “proton-sponge” effects for lysosome leakage¹⁹ or combine the use of photosensitizers to release the endocytosed cargos after light-triggered endosome disruption.²⁰ Nevertheless, these chemical approaches have intrinsically the potential to induce adverse effects after releasing the lysosomal content.

In principle, QDs coated with cell penetrating peptides (CPPs) or other transporting molecules can also be used, but

^aDepartamento de Física e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N, 50670-901, Pernambuco, Recife, Brazil. E-mail: adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br

^bDepartamento Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^cDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3tb20245c

with them it is more difficult to target intracellular structures specifically since at least two different chemical molecules have to be conjugated to the QD for delivery and labeling purposes (which are the CPPs and the targeting molecules).²³ Moreover, it is not clear whether the uptake of CPPs or their conjugates is endocytosis-dependent^{22,23} and they may carry the QD particles to different locations inside cells compared to non-conjugated CPPs.²⁴

Another common and important approach relies on lipofection, which uses electrostatic interactions between the external membrane of cationic liposomes and negatively charged materials (e.g. oligonucleotides) to promote charge-mediated adsorption to cells, endocytic uptake and release of endocytosed cargo after lysosomal destabilization.^{25,26} However, this approach is limited to the use of anionic cargos and depends on sequential processing steps that vary according to the cell types. The cytosolic release of the transported material is also subject to many variables, including endocytic competence and the net charge of the cargo-carrier system.^{25,27,28}

In this way, the design of a platform for the delivery of free nanoparticles into living cells, which does not depend on the cell uptake ability or the cargo charges, would open up many possibilities for new applications in biomedical and life sciences. In this work, we adapted the freeze and thaw method to encapsulate water synthesized carboxyl-coated CdTe QDs in liposomes of different compositions. Recently, Csizár *et al.*²⁹ reported direct fusion between non-functionalized cationic liposomes and the plasma membrane of different cell lineages. These liposomes with fusogenic properties are a valuable tool to investigate membrane fusion mechanisms and could also be used to design nanocarriers for intracellular delivery of membrane-impermeant compounds without the need for further chemical functionalization. Therefore, after confirming the encapsulation of liposomes with a more simple composition, we also included QDs in these liposomes with fusogenic properties and tested their ability to deliver these nanocrystals into living human-derived umbilical stem cells as well as into red blood cells (RBCs). The final fate of these nanoparticles is investigated and minutely discussed based on the physical-chemical properties of the cargo and the carrier, the QDs and liposomes, respectively. We believe that the method described here has the potential to be applied as a general route for encapsulation and intracellular delivery of any kind of membrane-impermeant material, including QDs and other classes of nanoparticles, and further, this work also gives some insights into the possible charge-mediated interactions between anionic QDs and cationic lipid bilayers.

Experimental methods

Quantum dot synthesis and characterization

Water dispersed MPA CdTe QDs were synthesized according to a previously reported method by some of us.³⁰ QDs were characterized by electronic UV-Vis absorption and emission spectroscopy (using respectively Ocean Optics HR4000 and ISS K2 equipment).

Liposome encapsulation of quantum dots

The following lipids were used in this study: egg phosphatidylcholine (EggPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DPPE-Rh). Three different liposomes were prepared: with EggPC (from now on referred to as PC), with PC:DOTAP and with DOPE:DOTAP:DPPE-Rh (the latter being the fusogenic formulation²⁹). The liposome preparation is described in detail in the ESI†

For encapsulation, QDs were purified to remove residues from the synthesis, the pH suspension was adjusted to approximately 7.5 using a 0.1% (v/v) MPA solution and then added to previously prepared plain vesicle-liposome suspension (3 : 10 QDs : liposomes v/v). QDs' encapsulation in liposomes was carried out after applying 6 to 10 freeze and thaw cycles using liquid nitrogen and a water bath (40 °C) plus vortexing sequentially. Alternatively, the lipid film was hydrated in the presence of the nanoparticles.

Plain and loaded liposomes containing QDs were analyzed by conventional fluorescence microscopy (Leica DMI4000B) and transmission electron microscopy (Hitachi H-300 electron microscope – the preparation of liposomes for this analysis is described in the ESI†). The systems were also analyzed by dynamic light scattering and zeta potential measurements (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). For the acquisition of micrographs by conventional fluorescence microscopy, green QD emission was excited and collected using band pass filters at 480/40 nm and 527/30 nm, respectively. Red liposome emission was detected using excitation and emission band pass filters at 560/40 nm and 645/75 nm, respectively. The images were acquired with a 40× (NA: 0.75) oil-immersion objective.

Cell incubation with fusogenic liposomes

Confluent stem cell samples, obtained after the third or fourth passages, were used for the experiment. First, an amount of 50 µL of 2 mM fusogenic plain liposomes was added to the cellular medium and incubated for 1 h with or without bovine serum medium for trial tests of liposome-membrane fusion at 37 °C and 4 °C. In these experiments, the cells were fixed for observation. Stem cells were washed twice with PBS buffer (137 mM NaCl, 10 mM phosphate, and 2.7 mM KCl) and fixed with 4% paraformaldehyde. Afterwards, the samples were washed twice with PBS.

For fusogenic liposome-mediated QDs' delivery, stem cells were incubated with 50 µL of 2 mM fusogenic loaded-QD liposomes and microscopic observations were performed in real time with living cells, before and during incubation at room temperature and analyzed without fixation. These liposomes were also incubated with red blood cells (RBCs). For the incubation procedure, 50 µL of a 1% (v/v) RBC fraction in saline was incubated with 20 µL of 2 mM loaded-QD liposomes and immediately observed on a microscope by around 20 minutes. As cellular labeling was never observed after incubation with free MPA QDs, even when the QD concentration was 10 fold

higher than that used for liposome encapsulation (see ESI† – Fig. S1†), we did not use purified liposomes for cell incubation.

Stem cells and RBCs were analyzed by conventional fluorescence microscopy (as described in Section 2.2). Stem cells were also observed by confocal fluorescence microscopy (multispectral Leica SPII-AOBS) under 488 nm excitation and the detection was centered at 530 and 630 nm for green and red signals, respectively.

Quantum dot–GUV interactions

We also studied the interaction of QDs with cationic Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) using a confocal microscope (details of GUV preparation is provided in the ESI†). A 405 nm laser was used to excite QDs through a 60× oil-immersion objective and the fluorescence spectra were collected in the region of 500–550 nm (Olympus FV100 multispectral confocal microscope).

Results

Water synthesized QDs are nanoparticles with sizes ranging from 2–20 nm depending on their surface coating.^{1–6} They are membrane-impermeant especially due to their size and physical–chemical properties (e.g. charge and surface coating). Therefore, to deliver QDs (or other materials displaying similar features), one has to surpass the biological plasma membrane barrier. Among the various methods reported, we choose to work with the recently developed liposomes with fusogenic properties to release the encapsulated nanoparticles after liposome fusion with cells.

Quantum dot synthesis and characterization

For the experiments, nanocrystals refluxed for 7 h at 90 °C were used, which generate green emitting QDs.³⁰ The resulting nanoparticles displayed a bright green emission band with a maximum centered at 540 nm and Full-Width at Half Maximum (FWHM) = 51 nm (Fig. 1 – excitation at 365 nm). By the analysis of the first absorption maximum at 476 nm, using Dagtepe's curve³¹ adapted from Rogach's sizing curve,³² the average QD size (d) was estimated to be $d = 2.5$ nm. The QD size obtained by

using absorption spectra is in good agreement with TEM and X-Ray diffraction analysis previously reported by us.^{30,33} The original concentration was estimated to be 40 μ M for these green QDs, using Peng's and collaborators equations.³⁴

Liposome encapsulation of quantum dots

In order to encapsulate QDs in liposomes, we tested and adapted the freeze and thaw method, known to efficiently encapsulate water soluble compounds.^{35,36} The simplest liposomal system used was composed of PC only. Fig. 2A(A1 and A2) shows frames of PC liposomes encapsulating fluorescent green QDs. The average encapsulation efficiency for PC liposomes was determined to be 35%. To our knowledge, it is a reasonable encapsulation efficiency for hydrophilic samples.³⁷

In order to generalize the process of QD encapsulation, we also tested the freeze and thaw method for a more complex system, PC : DOTAP (8 : 2 molar ratio), containing a cationic lipid. For this, we usually purified QD suspensions in order to eliminate contaminants from synthesis. This step helps to prevent some tendency of nanoparticles in precipitating highly positive lipid vesicles. Similar to those made with PC, cationic liposomes have also shown a bright green fluorescence after the freeze and thaw cycles (Fig. 2B). Interestingly, the more fluorescent the liposomes are, the darker they appear under phase contrast for all the compositions tested (fluorescent liposomes are optically denser because they are filled with particles – see ESI† – Fig. S2†), a further indication of the presence of nanoparticles inside the vesicles. It is worth noting that these images show larger vesicles, whereas smaller ones were also present in the samples (Fig. S2†). However, it was harder to resolve them by optical microscopy due their small dimensions and their Brownian motion.

In contrast to some reports in the literature,^{38–40} simple lipid film hydration in the presence of nanoparticles was not sufficient for us to observe an efficient encapsulation of QDs into liposomes, even though several different experimental conditions were tested (lipid and QD concentration, temperature, vortexing speed, and liposomal composition). It is also worth mentioning that simple QD incubation with plain liposomes did not result in fluorescent vesicles, although some very faint

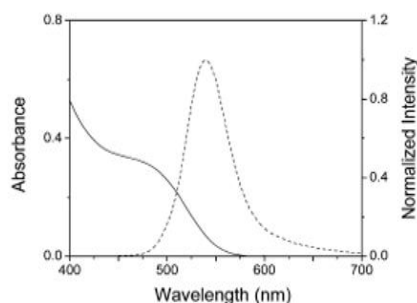


Fig. 1 CdTe QDs' optical characterization. Normalized absorption (solid line) and emission (dot line) spectra.

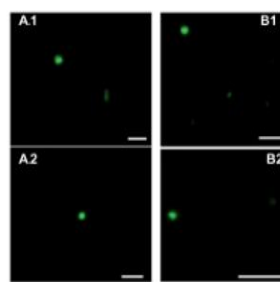


Fig. 2 Fluorescence microscopy images of CdTe QD loaded liposomes. (A) Encapsulation of green QDs in PC liposomes. (B) Encapsulation of QDs in cationic DOTAP-containing liposomes (20% DOTAP). Bars: 10 μ m.

fluorescence could be observed. In other words, the high intensity fluorescence, as seen in Fig. 2, is a result of encapsulation promoted by application of freeze and thaw cycles.

QDs are made of electron dense atoms which allow the identification of nanoparticles by transmission electron microscopy. This property, for example, has been used to localize the traffic and final fate of these nanomaterials into cells.^{41,42} We also probed QD encapsulation by transmission electron microscopy (TEM) of liposomes composed of either PC or PC:DOTAP lipids. Fig. S3 (ESI†) shows empty and QD-containing PC and PC:DOTAP (8 : 2) liposomes. Together with the fluorescence data, TEM images confirm the encapsulation of QDs in liposomes of different composition using the freeze and thaw method.

In order to predict the interactions of these loaded liposomes with cells, an important factor needs to be addressed: the surface charge of these QD-loaded liposomes. Surface charges play a key role in cellular adsorption⁴³ that may eventually lead to internalization of the material, which is highly promoted by positive charges.⁴⁴ Therefore, the different kinds of liposomes (loaded and unloaded), including the fusogenic ones, were characterized by their total surface charges. Fig. 3 shows representative zeta potential (ζ) values for the reported liposome-QD systems. Liposomes comprised of only PC lipids are negative under the experimental conditions (pH around 7.5) and the ζ potential is further decreased in the presence of MPA-coated QDs (since they present negative carboxyl groups on their surface at the reported pH). In contrast and as expected, liposomes containing cationic DOTAP lipids are always positive regardless the use of PC, PE or fluorescent lipids. However, DOTAP-containing liposomes presented a positive zeta potential reduction in the presence of QDs for all lipid compositions tested. Based on the above-mentioned results, one can expect favorable interactions between the cationic liposomes and cells, either containing or not containing QDs due to the net positive charges of the resulting system. Furthermore, the zeta potentials of loaded and unloaded liposomes were also higher than 20 mV (in modulus) indicating that all liposomal systems tested here were stable.⁴⁵

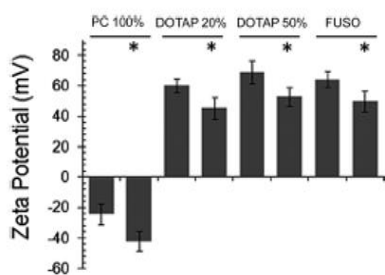


Fig. 3 Zeta potential of different liposomal systems. Asterisks indicate the encapsulated QDs, while their absence indicates empty vesicles. A decay in zeta potentials was observed in the presence of the MPA-coated QDs for all the liposomal systems.

The dynamic light scattering (DLS) analysis indicated average hydrodynamic sizes for the PC unloaded, PC loaded, fusogenic unloaded and fusogenic loaded systems of 150 nm, 100 nm, 160 nm and 250 nm, respectively. As the liposomes were analyzed and used after the freeze and thaw method (without further sonication or extrusion), the average PDI (polydispersity index) for the systems was approximately 0.4. Since there was a reasonable polydispersity presented in the liposomes' preparation, some larger vesicles were also observed and registered by microscopy analysis, when compared to DLS. With respect to the TEM images, although it was possible to see some smaller liposomes compatible with DLS analysis in Fig. S3D of the ESI,† we believe that the consecutive centrifugation steps of the TEM protocol help to select the larger ones to be imaged. Moreover, although very small vesicles could also be seen by optical microscopy, it was also easier to acquire good images from larger ones because of the Brownian motion and the resolution.

Fusogenic liposome encapsulation of quantum dots

In the previous sections we described an efficient method to encapsulate QDs in liposomes and showed that those liposomes containing DOTAP could be able to interact with cells due to the resulting positive surface charges. In the present section, we discuss the interactions of the fusogenic liposomes with human-derived umbilical stem cells as well as with RBCs and the perspectives to deliver membrane-impermeant materials into cells.

(a) **Testing the properties of fusogenic liposomes.** Lipid-based platforms offer an additional advantage (compared to other carrier systems) for delivery due to their high biocompatibility. They are also able to carry hydrophilic and lipophilic substances and modulate their interactions with the plasma membrane by choosing specific phospholipids for their composition. We choose to work with the recently developed formulations reported by Csiszár *et al.* because they were able to fuse with a large variety of cells.²⁹ Since the fusogenic activity of these systems is dependent on the use of fluorescent lipids, fusion can be followed by the presence of fluorescence in cells. Fig. 4A shows that the whole stem cell population was labeled after fusion with these liposomes and Fig. 4B shows that detailed plasma membrane projections of the cells can be clearly distinguished (arrows). These results are a strong indication of liposome-cell membrane fusion rather than internalization of the vesicles since the cells are homogeneously labeled, in contrast to what would be observed in the case of endocytosis, which would yield only intracellular spotted-like fluorescence.

We could also capture the interaction of fluorescent vesicles with the plasma membrane followed by fusion. Staining of the plasma membrane (Fig. 4C), as well as membrane projection (filopodial-like) structures, can be seen by confocal fluorescence microscopy after the arrival of vesicles onto the membrane (arrowhead in Fig. 4D). However fluorescence from intracellular structures is also observed (Fig. 4C, cells 1 and 2). The latter finding may indicate either (i) there is also some

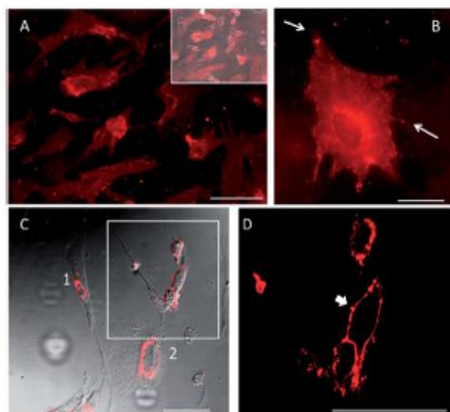


Fig. 4 Fusion of liposomes with stem cells observed by fluorescence microscopy. (A) All cells are labeled by fusogenic liposomes. (B) Fluorescence of membrane projections may be observed (arrows). (C) Different patterns of cellular labeling during/after fusion. Cells 1 and 2 display intracellular fluorescence rather than on the surface. (D) Zoom of the region marked in C showing the arrival of the vesicle followed by membrane fusion. Bars: (A): 100 μm ; (B): 25 μm ; (C–D): 75 μm .

endocytosis of the vesicles (besides liposome–membrane fusion) or (ii) there is an inward trafficking of the fluorescent plasma membrane (as will be discussed later).

In order to further characterize the mechanisms of interaction, we performed some modifications in the experimental conditions. Incubation at low temperature (4 $^{\circ}\text{C}$), known to transiently interrupt an active-dependent process such as endocytosis, yields fluorescence labeling similar to that at 37 $^{\circ}\text{C}$, in which the cellular contour (plasma membrane) is stained (Fig. 5A). Moreover, we observed that liposomal fusion is dependent on the relative amount of fluorescent lipids. A ten-fold reduction in the concentration of DPPE-Rh significantly affects the ability of these liposomes to fuse with cells as only few cells are labeled per field (Fig. 5B). Fig. 5C shows the fluorescence image of the labeled cell shown in 5B to demonstrate the same labeling features (cellular contour and detailed membrane projections – arrows). It demonstrates an active role of the fluorescent lipid to trigger fusion rather than being a simple marker. The process is also affected by the presence of bovine serum. For instance, when bovine serum was present in the medium no labeling was observed (Fig. 5D). These results highlight the fusion as the main (if not the only) process in the interaction of these liposomes with cells and the experimental conditions in which it occurs.

(b) Intracellular delivery of QDs encapsulated in fusogenic liposomes. Once we have demonstrated the efficiency of the freeze and thaw method for QD encapsulation in liposomes and established the conditions of liposome–cell fusion, fusogenic liposomes containing QDs were incubated with live stem cells for the observation of QDs' release into cells. Under ideal conditions, the liposome–QD system will fuse with the plasma cell membrane releasing free encapsulated particles inside the

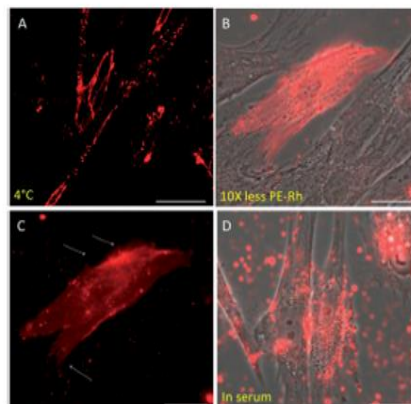


Fig. 5 Conditions under which fusion does (or does not) occur. (A) Confocal image shows that fusion still occurs during incubation at low temperature. (B) We observe the fluorescence of a single cell in the sample when a ten-fold reduction in the amount of fluorescent lipids is used. (C) Fluorescence image of the labeled cell shown in (B) displaying the same features after fusion. Arrows show membrane details. (D) We observe the lack of membrane labeling after incubation in the presence of serum proteins. Bars: (A) 75 μm ; (B–D): 25 μm .

cytosol, which would be seen as a green diffuse pattern in the cell interior. Fig. 6 shows typical real time images of the intracellular delivery of QDs by fusogenic liposomes. After a few minutes of incubation, some cells visualized by differential interference contrast (DIC) microscopy (Fig. 6A) presented red fluorescence (corresponding to the Rhodamine-labeled liposomes) followed by a green fluorescence (corresponding to QDs) – Fig. 6B and C, respectively. Interestingly, merged images always show co-localized red/green fluorescence (Fig. 6D and E). It is an indication that liposomes and QDs are in close proximity and that the QDs are probably not released from the (former liposome) membranes, that is, into cells. If very closer interactions occur, it is possible that some green fluorescence from QDs might be transferred to red-labeled membranes, leading to a weaker QD fluorescence intensity. Therefore, under the experimental conditions reported here, fusogenic liposomes containing carboxyl-coated QDs were unable to release freely diffusing QDs into the cell cytosol.

We further investigated the delivery of QDs by fusogenic liposomes using RBCs (good cellular models because they do not perform endocytosis). Upon incubation of fusogenic liposomes containing QDs, the cells almost immediately displayed red fluorescence (fusion) followed by a green signal from the QDs (Fig. 7A). As in the case of stem cells, the same pattern was observed for RBCs: both signals are co-localized and no QDs were found inside the RBCs (no intracellular release). These results for a simplified cellular model support the hypothesis of interaction between the charged species in the membrane fusion process.

MPA QDs did not exit the liposomes due to their incapacity to passively cross lipid bilayers, as well documented for most

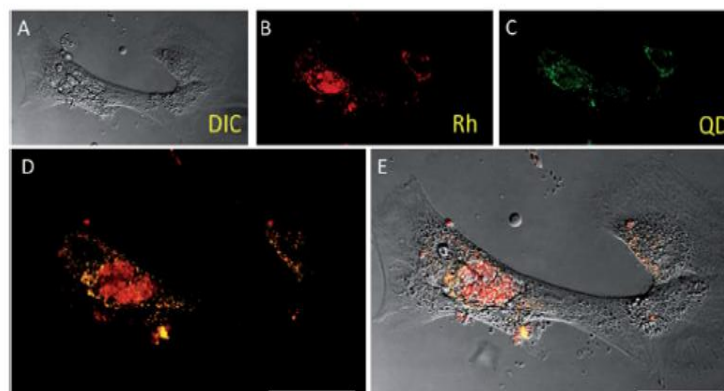


Fig. 6 Intracellular delivery of QDs mediated by fusogenic liposomes. (A–C) DIC, red liposome signal and green QD signal after incubation with stem cells. (D) Fluorescence overlay showing co-localized emission. (E) Merged fluorescence and DIC images. Bars: 50 μm .

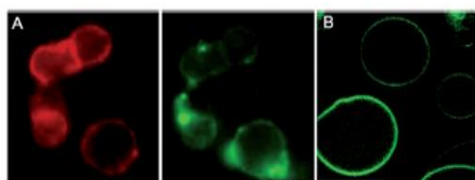


Fig. 7 (A) Frames of co-localized signals of liposomes (red) and QDs (green) on the RBC surface after membrane fusion. (B) QD adsorption onto the surface of PC:DOTAP GUVs (5% of DOTAP lipids) for simulating fusogenic liposomes and further understanding the co-localized signal and interactions of negatively charged QDs and cationic lipids. Bars in (A): 3 μm and in (B): 25 μm .

water-soluble and charged QDs.⁴⁶ This was further confirmed by the fact that we observed that bare MPA QDs (even when the QD concentration was 10 fold higher than that used for liposome encapsulation) were not able to label either RBCs or stem cells. Once encapsulated, QDs must stay trapped in the liposomal core without being released or leaked. QDs should be released only after fusion with cells and the fusion was a process that occurred quickly.

In order to further understand the interactions of anionic QDs with cationic lipids, GUVs were used. As we could not produce GUVs with the actual fusogenic composition, we worked with PC doped with 5% of the cationic DOTAP lipids to yield positive membrane simulating fusogenic vesicles. In this sense, electrostatic interactions (binding) between negative QDs and positive GUV membranes have been observed, as shown in Fig. 7B. This procedure was performed to further explain the co-localized fluorescence in cells observed using a microscope. This experiment was different from those shown in Fig. 2, where we showed QD encapsulation after freeze and thaw cycles. As can be seen in Fig. 7B, the membranes are homogeneously labeled by the nanoparticles, with no detectable signal (passage through) into the lumen of the vesicles. There were some

pattern variations from vesicle to vesicle concerning the labeling intensity, although the general profile was almost identical. This result shows the favorable binding of the negatively charged QDs and cationic lipid bilayers, easily observable using micrometer-scaled GUVs.

Discussion

With the objective of releasing non-permeant QD nanoparticles into cells, we encapsulated them in liposomes with fusogenic properties. The observation of co-localized QDs and lipid signals after fusion with cells indicates that both of them are present in cell membranes after fusion and are spatially close. Once the fusion occurs, QDs should have free access to the cell cytosol. However, we believe that the co-localized fluorescence is a result of a connection between the carboxyl-coated QDs and cationic lipids (even after fusion), probably due to charge attractions that make them capable of interacting electrostatically (evidence also supported by binding of nanoparticles to cationic GUV membranes). Such attachment can also explain the changes in the zeta potential observed after QD encapsulation procedures. This hypothesis is supported by the work described by Zhang *et al.*, where the authors demonstrated that adsorption between charged QDs and zwitterionic membranes can be favored by charges, which in turn can be controlled by the environmental pH and by the membrane and QD compositions.⁴⁷ The authors have shown the existence of an “adsorption window” that can govern the binding (or not) of QDs to lipids when these species display opposite charges. In this way, interactions between the negative carboxyl-coated QDs and cationic membranes (liposomes or cells) may well explain the co-localized pattern observed in Fig. 6 and 7.

Based on the above-mentioned scenario, we propose a possible and simplified mechanism of QD delivery to cells mediated by these fusogenic liposomes as illustrated in Fig. 8. Fig. 8A represents the interaction and fusion of liposomes with the plasma cell membrane. Under ideal conditions, membrane

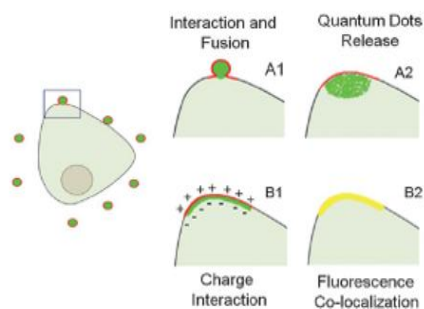


Fig. 8 Illustration of the liposome-mediated QD delivery into cells. Under ideal conditions, after incubation, red fluorescent liposomes interact and fuse with the cell membrane (A1), releasing encapsulated QDs into the cytosol (A2). However, after fusion, charge mediated interactions of MPA-QDs and cationic lipids (B1) impair QD release into the cell, yielding a yellow co-localized signal (B2).

fusion (Fig. 8A1) would lead to cell labeling and release of free QDs inside the cytosol (Fig. 8A2). However, based on the pattern observed by microscopy and on the considerations described above, MPA-coated QDs and cationic lipids are in close contact due to charge-mediated interactions (Fig. 8B1), yielding a co-localized yellow signal (Fig. 8B2).

Some attempts on the use of liposomes to deliver QDs to cells have been described in the literature. Bothun *et al.* have shown a clear difference between the final fate of neutral zwitterionic and cationic liposomes in cells: while the former fail to enter into cells and agglomerate on the cell surface, the latter are taken up and localized in perinuclear areas.⁴⁸ Hydrophobic and hydrophilic QDs co-encapsulated in liposomes were also taken up by cells *via* endocytosis,⁴⁹ however all of them failed to release free nanoparticles into the cytosol and end up trapped in endo/lysosomes instead; or they are trafficked as agglomerates of nanoparticles.⁴⁹ Sigot *et al.* reported a sophisticated system, in which dual-color QDs were encapsulated or attached to biotinylated liposomes containing either fusogenic or pH-sensitive lipids, and the traffic was monitored by fluorescence co-localization images.⁵⁰ However, they have shown that neither of the liposome-QD systems was able to fuse with the cell membrane (plasma and/or endosomal) and release the encapsulated QDs after endocytosis.

In another study, Gopalakrishnan *et al.* have shown that hydrophobic QDs embedded in the bilayer of cationic liposomes containing small amounts of pegylated lipids exhibited fusogenic properties, however, the QDs remained in the plasma membrane after fusion rather than being delivered to the cell interior.⁵¹ In contrast to that work, we used hydrophilic QDs with the aim of releasing the nanoparticles into cells. By analyzing our results we believe that the localization in the membrane is due to adsorption forces rather than being embedded in it. Moreover, some authors have demonstrated that amphiphilic uncharged QDs can translocate the membrane of GUVs and RBCs.^{52,53} It is important to observe that any further QD conjugation would modify their size, surface charge and physico-chemical properties, and may consequently impact their membrane translocation behavior.

These above cited studies and also our studies highlight the importance of understanding the interactions between nanoparticles and cell membranes since they will ultimately dictate the pathway(s) of intracellular delivery. Therefore, it is clear that much effort is worth and has to be applied for the purpose of intracellular delivery, especially when using liposomes as the carrier. The development of such a system will help not only to deliver nanoparticles (and any other membrane-impermeant compound), but also benefits this field bringing a deeper understanding of the controlling parameters involved in these purposes.

We conclude by pointing out some aspects of our reported system:

- (i) These vesicles can modify the (negative) membrane of the cell incorporating positive lipids. This is, however, a transient state, where the incorporated material is rapidly trafficked to the recycling pathway in which the rate and fate are highly dependent on the lipid composition.⁵⁴ This must be the reason for the spotted-like fluorescence from cells 1 and 2 in Fig. 4C, again pointing out the process as fusion rather than internalization;
- (ii) The pathway is endocytosis-independent (although we cannot ensure a fusion-only process);
- (iii) The delivery of QDs into the cells, as reported here, can be a combination of QDs encapsulated and adsorbed in and/or on liposomes, with emphasis on the former since only very faint fluorescence signals were observed for simple QDs incubated with liposomes while very bright images were observed for liposomes encapsulating QDs.
- (iv) In contrast to lipo/polyplex systems, which bind only to negative materials, virtually any cargo can be transported after encapsulation in fusogenic liposomes as long as we take into account possible charge-mediated interactions.
- (v) Intrinsic limitation on the use of multicolored fluorescent cargo is due to the mandatory presence of a fluorescent lipid-analogue in the liposomal composition. In other words, there might be an overlay in the emission of the lipid-analogue (liposomes) and that from fluorescent cargo. Nevertheless, since the formulation requires only the presence of an electro-negative radical in the molecule, such fluorescence can be tuned over the whole spectral range by the correct choice of the probe. Moreover, the narrow emission of QDs may further facilitate their detection. Furthermore, the presence of a fluorescent probe in the liposomes allows the observation of the trafficking pathway itself as in the present study.
- (vi) The use of the freeze and thaw method can be harmful to sensitive materials, such as proteins. The sequential freezing can cause changes in the material properties. Other methods for encapsulating membrane-impermeant materials can also be used. However they should yield similar results.

Conclusions

The area of intracellular delivery is a fast emerging field where much effort needs to be taken to reach the complete goal, starting from the design and construction of the cargo-carrier complex up to the intracellular delivery of the material after

interaction with and processing by cells. A deep understanding on the factors affecting all of these parameters is paramount to the development of more efficient and safer delivery systems. In this work, we showed that freeze and thaw is an efficient method for encapsulating QDs in liposomes for intracellular delivery purposes; nevertheless, charge-mediated interactions seems to play an important role in the delivery of these carboxyl-coated QDs to live cells mediated by cationic fusogenic liposomes.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, CNPq and FACEPE. This work is also linked to the National Institute of Photonics (INCT-INFO). We would like to thank the Laboratory of Non-Conventional Polymers (UFPE) for the analysis in the Zeta Nano ZS 90 equipment, Renato Grillo from Campinas State University for his helpful advice in the TEM sample preparation and observation, Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM) for the confocal images, Professor Kátia R. Perez for helping with the determination of encapsulation efficiency and Professor Karin Riske for kindly providing phospholipids for this research. We would like to dedicate this work in memory of Prof. Oleg Vladimirovich Krasilnikov.

References

- U. R. Genger, M. Grabolle, S. C. Jaricot, R. Nitschke and T. Nann, *Nat. Methods*, 2008, **5**, 763–775.
- X. Michalet, F. P. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538–544.
- P. A. Alivisatos, J. R. M. Bruchez, M. Morone, P. Gin and S. Weiss, *Science*, 1998, **281**, 2013–2016.
- I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 435–446.
- X. Michalet, L. A. Bentolila and S. Weiss, *Molecular Imaging: Physics and Bio-Applications of Quantum Dots in Advances in Medical Physics*, ed A. B. Wolbarst and W. R. Hendee, Medical Physics Publishing, Madison, 2008.
- A. Fontes, R. B. Lira, M. A. B. L. Seabra, T. G. Silva, A. G. C. Neto, B. S. Santos, in *Biomedical Research in Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine*, INTECH, Croatia, 2012, p. 269.
- D. E. Ferrara, D. Weiss, P. H. Camell, R. P. Vito, D. Vega, X. Gao, S. Nie and W. R. Taylor, *Am. J. Physiol. Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 2006, **290**, 114–123.
- S. S. Rajan and T. Q. Vu, *Nano Lett.*, 2006, **6**(9), 2049–2059.
- V. P. Torchilin, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006, **8**, 343–375.
- C. E. Thomas, A. Ehrhardt and M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 3346–3358.
- D. Karra and R. Dahm, *J. Neurosci.*, 2010, **18**(30), 6171–6177.
- P. Washbourne and A. K. McAllister, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2002, **12**, 566–573.
- D. Miklavic and M. Puc, *Electroporation in Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, John Wiley & Sons, New York, 2006, pp. 1455–1465.
- T. Y. Tsong, *Biophys. J.*, 1991, **60**, 297–306.
- F. Chen and D. Gerion, *Nano Lett.*, 2004, **4**(10), 1827–1832.
- A. M. Derfus, W. C. W. Chan and S. N. Bathia, *Adv. Mater.*, 2004, **16**(12), 961–966.
- B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. Brivanlou and A. H. Libchaber, *Science*, 2002, **298**, 1759–1762.
- K. Boeneman, J. B. Delehanty, K. Susumu, M. H. Stewart and I. L. Medintz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 5975–5977.
- M. V. Yezhelyev, L. Qi, R. M. O'Regan, S. Nie and X. Gao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **130**, 9006–9012.
- S. Febvay, D. M. Marini, A. M. Belcher and D. E. Clapham, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2211–2219.
- A. M. Derfus, A. A. Chen, D.-H. Min, E. Ruoslahti and S. N. Bhatia, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**(5), 1391–1396.
- R. Sawant and V. Torchilin, *Mol. Bio. Syst.*, 2006, **6**, 628–640.
- J. B. Delehanty, I. L. Medintz, T. Pons, F. M. Brunel, P. E. Dawson and H. Mattoussi, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 920–927.
- B. Chen, Q. Liu, Y. Zhang, L. Xu and X. Fang, *Langmuir*, 2008, **24**, 11866–11871.
- L. Wasungu and D. Hoekstra, *J. Controlled Release*, 2006, **116**, 255–264.
- V. P. Torchilin, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006, **8**, 343–375.
- M. R. Almofti, H. Harashima, Y. Shinohara, A. Almofti, Y. Baba and H. Kiwada, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **410**, 246–253.
- A. Noguchi, T. Furuno, C. Kawaura and M. Nakanishi, *FEBS Lett.*, 1998, **433**, 169–173.
- A. Csizsar, N. Hersch, S. Dieluweit, R. Biehl, R. Merkel and B. Hoffmann, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 537–543.
- R. B. Lira, M. B. Cavalcanti, M. A. B. L. Seabra, D. C. N. Silva, A. J. Amaral, B. S. Santos and A. Fontes, *Micron*, 2012, **5**(43), 621–626.
- P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski and V. J. J. Leppert, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 14977–14983.
- A. L. Rogach, T. Franzl, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmüller, Y. P. Rakovich and J. F. Donegan, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 14628–14637.
- A. Fontes, B. S. Santos, C. R. Chaves and R. C. B. Q. Figueiredo, II-VI Quantum dots as fluorescent probes for studying trypanosomatids, in A. Al-Ahmadi, ed *Quantum Dots - A Variety of New Applications*, Intech, Rijeka, 1st edn, 2011, pp. 241–260.
- W. W. Yu, L. Qu, W. Guo and X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, **15**, 2854–2860.
- F. Szoka Jr. and D. Papahadjopoulos, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1980, **9**, 467–508.
- P. Walde and S. Ichikawa, *Biomol. Eng.*, 2001, **18**, 143–177.
- T. Nii and F. Ishii, *Int. J. Pharm.*, 2005, **28**, 198–205.
- W. T. Al-Jamal, K. T. Al-Jamal, P. H. Bomans, P. M. Frederik and K. Kostarelos, *Small*, 2008, **4**(9), 1406–1415.
- C. Yang, N. Ding, Y. Xu, X. Qu, J. Zhang, C. Zhao, L. Hong, Y. Lu and G. Xiang, *J. Drug Targeting*, 2009, **17**(7), 502–511.
- M. Chu, S. Zhuo, J. Xu, Q. Sheng, S. Hou and R. Wang, *J. Nanopart. Res.*, 2010, **12**, 187–197.

- 41 B. N. G. Giepmans, T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 743–749.
- 42 C. R. Chaves, A. Fontes, P. M. A. Farias, B. S. Santos, F. D. de Menezes, R. C. Ferreira, C. L. Cesar, A. Galembek and R. C. B. Q. Figueiredo, *Appl. Surf. Sci.*, 2008, **3**(255), 728–730.
- 43 Y. Zhang, M. Yang, N. G. Portney, D. Cui, G. Budak, E. Ozbay, M. Ozkan and C. S. Ozkan, *Biomed. Microdevices*, 2008, **10**, 321–328.
- 44 A. Verma and F. Stellacci, *Small*, 2010, **6**, 12–21.
- 45 F. Quemeneur, M. Rinaudo, G. Maret and B. Pépin-Donat, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4471–4481.
- 46 J. B. Delehanty, H. Mattoussi and I. L. Medintz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**(4), 1091–1105.
- 47 X. Zhang and S. Yang, *Langmuir*, 2011, **27**(6), 2528–2535.
- 48 G. D. Bothun, A. E. Rabideau and M. A. Stoner, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2009, **113**, 7725–7728.
- 49 V. Dudu, M. Ramcharan, M. L. Gilchrist, E. C. Holland and M. Vazquez, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2008, **8**, 2293–2300.
- 50 V. Sigot, D. J. Arndt-Jovin and T. M. Jovin, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 1465–1472.
- 51 G. Gopalakrishnan, C. Danelon, P. Izewska, M. Prummer, P.-Y. Bolinger, I. Geissbühler, D. Demurtas, J. Dubochet and H. Vogel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 5478–5483.
- 52 T. Wang, J. Bai, X. Jiang and G. U. Nienhaus, *ACS Nano*, 2012, **2**(6), 1251–1259.
- 53 A. Dubavik, E. Sezgin, V. Lesnyak, N. Gaponik, P. Schwill and A. Eychmüller, *ACS Nano*, 2012, **3**(6), 2150–2156.
- 54 C. Kleusch, N. Hersch, B. Hoffmann, R. Merkel and A. Csizsar, *Molecules*, 2012, **17**(1), 1055–1073.

VI – MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido à revista *Current Nanoscience*.

Fusogenic Liposomes Loaded with Positive Quantum Dots For Intracellular Delivery in Live Cells

Anna Livia Linard Matos^a, Goreti Pereira^b, Beate Saegesser Santos^b and Adriana Fontes^{*a}

^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; ^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract: Quantum dots (QDs) are fluorescent nanocrystals, which possess unique optical properties, being the top one their photostability. However, their use for intracellular study is still limited because their passage through the cell membrane does not occur passively. QDs usually are internalized by cells and become trapped in endocytic vesicles, requiring a method to deliver them freely into the cytosol. In this work, we developed and improved an approach using the ethanol injection method to encapsulate cationic hydrophilic QDs into fusogenic liposomes and deliver them in living cells. The liposomes were characterized by zeta potential measurements, dynamic light scattering analysis, fluorescence microscopy and transmission electron microscopy. Throughout the entire study, the red blood cells (RBCs) were important models to probe the fusion between the liposome and the cellular membrane, since they do not have endocytic activity. The studies were done with RBC and also HeLa cells, and showed that liposomes prepared by the ethanol injection method were able to deliver QDs in living cells. Results suggested that there are some QDs in the cytosol, however, additional studies are needed to prove if the QDs are really free or not inside the cell. This method has potential for encapsulating QDs bioconjugated to biomolecules because it does not use the freezing process generally applied in film hydration liposomes approaches. We hope that this study will help the development of effective methods to release QDs into the cytosol, allowing the possibility of using the advantages of these fluorescent probes to better understand intracellular processes.

Keywords: Liposomes encapsulation, Quantum dots, Fluorescence, Red blood cells, HeLa cells.

1. INTRODUCTION

The comprehension of how intracellular processes work, such as how a healthy cell can change to a tumor cell, and how it can grow to a tumor tissue, or how can stem cells perform their roles in therapies, are fundamentals aims in life sciences. One way to elucidate these processes is using fluorescence assays. Fluorescence-based techniques have high sensitivity and specificity, and also allow the monitoring of the dynamics of biological events in real time^[1].

A class of materials that has emerged as fluorescent probes for cell labeling and biomedical research are the quantum dots (QDs). QDs are fluorescent semiconductor nanocrystals that possess unique optical properties, such as low photobleaching rates, wide absorption spectrum, narrow emission spectrum, emission tuned with their size and chemically active surface^[2].

To take full advantages of these nanocrystals in intracellular studies, they have to be delivered freely into the cytosol, because its passage through the cell membrane does not occur passively. QDs become trapped in endocytic vesicles. Among the methods already described for QDs intracellular delivery, we can highlight the electroporation, the microinjection and the cell fixation. Nevertheless, these techniques have some disadvantages, are laborious methods or can damage the cells. In this context, liposomes appear as a tool to solve these drawbacks, being vesicles of lipid bilayers that can fuse with the cells releasing its contents into the cytosol^[3].

Csiszár and co-authors^[4] described liposome formulations that were able to fuse with cells. In these liposomes, the combination of a fluorescent lipid associated with a dye with two other lipids (DOTAP and DOPE), is capable of destabilizing the membrane and cause the fusion of the liposomes with the cells, which is essential to trigger the process.

In the literature, there are only a few reports of encapsulation of hydrophilic QDs in liposomes, using thin film hydration^[5], reverse evaporation method^[6] and detergent dialysis^[7]. However, as far as our knowledge goes, the studies reported

*Address correspondence to this author at the Department of Biophysics and Radiobiology, Biology Sciences Center, Federal University of Pernambuco, P.O. Box: 50670-901, Recife, Brazil; Tel/Fax: +55-81-21268560 and +55-81-21267818; E-mails: adriana.fontes.biofisica@gmail.com

show only membrane labeling by QDs, none of them deliver the QDs freely in the cytosol^[5-7].

In our previous work, we encapsulate CdTe QDs stabilized/functionalized with mercaptopropionic acid, negatively charged, in fusogenic liposomes, using the freezing and thawing method. We were able to deliver QDs in living cells, but there was no release of free QDs in the cytosol, probably due to electrostatic interactions between the cationic lipids and the anionic QDs^[8]. To overcome this situation, in this work, we decide to encapsulate positively charged CdTe QDs, stabilized/functionalized with cysteamine, into the liposomes to avoid these interactions. We also resolve to adapt the ethanol injection method to encapsulate QDs in liposomes to probe their delivery into living cells. In this work we used red blood cells (RBCs) and HeLa cells to test these liposomes-cells interactions. To our knowledge, this is the first report about encapsulation of hydrophilic QDs by using the ethanol injection method, as well as is the first one that uses cationic QDs. We hope that this study will help to expand the use of QDs as fluorescent probes to label and study biochemical process that occur not only at membrane level but also inside the living cells.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Materials

Cysteamine (Cis), cadmium perchlorate ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodium borohydride (NaBH_4), tellurium (Te^0) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The lipids 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-dielaidoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DPPE-Rh) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA), and the soybean phosphatidylcholine (PC) was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Lipid stock solutions were prepared in ethanol. Routine chemicals were purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). All the chemicals used were at analytical grade and ultrapure water (18.2 M Ω) was used in all experiments.

2.2. Quantum Dot CdTe-Cis Synthesis and Characterization

CdTe QDs were synthesized in aqueous colloidal dispersion, according to the previously method reported by our research group with modifications^[9]. Te^{2-} ions in aqueous solution were added to a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ solution at pH 5.8 in the presence of cysteamine as the stabilizing agent, in a ratio of 10:1:12 for Cd:Te:Cis, respectively. The reaction proceeded under constant stirring and heating at approximately 90 °C for 1 h. At the end, the nanocrystals were automatically functionalized with cysteamine. The Te^{2-} aqueous solution was prepared by reducing metallic tellurium with NaBH_4 at a high pH under nitrogen saturated atmosphere and continuous heating (~90 °C).

QDs were characterized by electronic UV-Vis absorbance spectroscopy (Evolution 600, Thermo Scientific) using ultra-

pure water as reference, and by emission spectroscopy (LS 55, PerkinElmer), exciting the sample at 365 nm.

The average diameter (*d*) of the QDs was estimated using the Dagtepe equation (Eq. 1) and the wavelength at the first absorption maximum (λ)^[10].

$$d = (1.38435 - 0.0066\lambda) / (1 - 0.0121\lambda) \quad \text{Eq. 1}$$

The molar extinction coefficient (ϵ) was calculated by using the Yu's equation (Eq. 2)^[11] and by applying the Beer-Lambert equation it was determined the concentration of the QD's suspension.

$$\epsilon = 10043(d)^{2.12} \quad \text{Eq. 2}$$

2.3. Liposomes and Liposomes-QDs Preparation and Characterization

Three different liposomes were prepared: PC and DOPE:DOTAP as the non-fusogenic systems, and DOPE:DOTAP:DPPE-Rh as the fusogenic one^[4]. Typical 1.3 mM final phospholipid concentration was used to prepare the vesicles. Molar ratios of 1:0.3 were used for DOPE:DOTAP. The DOPE:DOTAP:DPPE-Rh liposomes were prepared using different molar ratios depending on the experiment, such as 1:0.3:0.05 and 1:0.7:0.05. The two steps injection method^[12] was applied to prepare either empty or QDs loaded liposomes.

First, to obtain 1.5 mL of plain liposomes, the amount of 1.5 mL of NaCl (0.001 M) was added to a test-tube, and then heated up to 55 °C ($\pm$ 5 °C). Simultaneously, in a second vial glass, the lipid solution was also heated to 55 °C ($\pm$ 5 °C). The lipid mixture was then injected, under vigorous stirring (vortex), into the NaCl solution and the plain liposomes were formed in *ca.* 2 min. Using the injection method, the QDs loaded liposomes were prepared by mixing an aliquot of 1.5 mL consisted of 70% of NaCl (0.001 M) and 30% of hydrophilic QDs. The procedure follows the same step used for plain liposomes, heating the lipid mixture in a vial glass and injecting them to the NaCl-QDs' tube. For preparing the liposomes, QDs were purified to remove precursor residues by using Vivaspinn concentrator devices of 10 MWCO (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and centrifuging them for 2 min at 335 $\times g$. This procedure was performed twice. For removing the non-encapsulated QDs, it was used an Amicon® 100 MWCO filter device (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for centrifuging the liposomes for 2 min at 524 $\times g$. This process was also performed twice.

Plain and QDs loaded liposomes (L-QDs) were analyzed by conventional fluorescence microscopy (Leica DMI 4000B) and transmission electron microscopy (FEI TECNAI Spirit BioTwin G2). The systems were also analyzed by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). For the acquisition of micrographs by conventional fluorescence microscopy, using the 480/40 nm band pass filter excited green emitting QDs and their fluorescence was collected with the 527/30 nm band pass filter. The red emission of liposomes was excited and detected using excitation and emission band pass filters at 560/40 nm and 645/75 nm, respectively. Due to liposomes Brownian motion, to acquire a better analysis by

optical microscopy, glass slides were covered with poly-L-lysine solution 0.1% w/v in H₂O (Sigma-Aldrich). For TEM analysis *ca.* 6 μ L of the desired liposome was dropped onto 200-mesh holey carbon-coated copper grids, and placed under Osmium steam for 1 min.

2.4. DOTAP Assays

Highly positively charged liposomes can be harmful to living cells. Due to the high charge difference between these vesicles and cell membranes, liposomes can lead to cell death or homeostasis loss^[13]. To determine the less harmful DOTAP concentration in the liposomes, which still keeps their fusogenic ability and the cells homeostasis, we have performed a study using a flow cytometry assay (AccuriTM C6, Becton Dickinson). RBCs were used to probe the fusion process and the homeostasis, since they present a surface very sensitive to charge variations and do not perform endocytosis. Only if the liposomes fuse to RBCs, it will be detected fluorescence signals in the flow cytometry analysis.

Blood was collected in EDTA tubes and then centrifuged at $679 \times g$ for 5 min. The plasma was removed and saline (0.9%) was added. Then, RBCs were washed twice ($679 \times g$ for 2 min) and diluted to 1% (v/v) also in saline to be used.

Four different DOTAP concentrations were used: 0.3, 0.5, 0.8 and 1 mM. DOPE and DPPE-Rh concentrations were set in 1 and 0.1 mM, respectively. Liposomes were prepared by the same methodology described in the later section.

RBCs were incubated with liposomes in microtubes using the volume of 15% of liposomes for the total volume of cells, for example 42.5 μ L of RBCs at 1% and 6.5 μ L of fusogenic liposomes. Cells were analyzed after 1 min of incubation.

For flow cytometry analysis around 20,000 events/gate were acquired under excitation at 488 nm. The red emission was detected with the band pass filter FL2 (585/20 nm) and the data were processed by Accuri C6 software – Becton Dickinson. The homeostasis was evaluated by the SSC (side scatter) in function of FSC (forward scatter) analysis.

2.5. Cells Fluorescence Microscopy Analysis

RBCs and HeLa cells were incubated with liposomes and analyzed by conventional fluorescence microscopy (Leica DMI 4000B). As the fusion process occur quickly^[5a], the cells were not incubated with the liposomes for more than 5 min. Green emitting QDs were excited using the band pass filter 480/40 nm and the fluorescence was detected by the 527/30 nm band pass filter. The red emission of liposomes was excited and acquired by the band pass filters 560/40 nm and 645/75 nm, respectively. Blue fluorescence of DAPI was excited using UV band pass filter at 360/40 nm and the emission was acquired using the band pass 470/40 filter.

RBCs were prepared as described before. To fluorescence microscopy analysis, 20 μ L of RBCs at 1% (v/v) were incubated with 3 or 6 μ L of fusogenic or cationic liposomes. For the fusogenic liposomes, it was tested different lipid

ratios, 1:0.7:0.05 and 1:0.3:0.05, for DOPE, DOTAP and DPPE-Rh respectively. For the cationic liposomes, it was used the DOPE:DOTAP at 1:0.3 molar ratio. RBCs were used to visualize the delivery of QDs, since these cells do not perform endocytosis.

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose (DMEM – Sigma Aldrich) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS - Gibco), 100 mg/mL⁻¹ streptomycin and 100 units/mL⁻¹ penicillin (Sigma Aldrich) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. When HeLa cells covered the whole bottom of the culture bottle, they were digested with 0.25% of trypsin-EDTA Dissociation Buffer (Gibco). Then, cells were seeded into a 6-well plate (1.5×10^5 cells/well) and incubated for 24 h. After this time, we obtained cells suspension using 0.25% of trypsin-EDTA and the cells were 2 times washed in PBS using $1200 \times g$ (MiniSpin - Eppendorf). The amount of 20 μ L of cells (10^4 cells/mL) in PBS was placed in contact with 3 or 6 μ L of the same fusogenic liposomes (loaded and unloaded with QDs) used with RBCs.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS:

3.1. Quantum Dot CdTe-Cis Characterization

Optical characterizations were used to evaluate the QDs quality, estimate their average size and concentration. CdTe-Cis QDs displayed a bright green emission, with a maximum at 563 nm (39.5 nm of Full-Width at Half Maximum - FWHM) and a first absorption maximum at 495 nm (Fig. 1). Applying the Dagepe' equation, the average QDs size was estimated as 2.6 nm diameter. Using the Beer-Lambert equation, the concentration was estimated as 25.5 μ M.

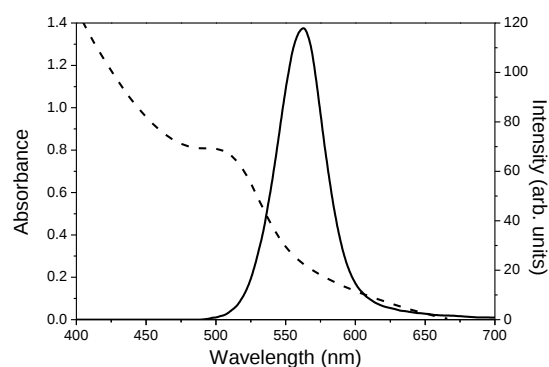


Fig. 1: CdTe-Cis QDs optical characterization. Absorption (dashed line) and emission (line) spectra.

3.2. Liposomes and Liposomes-QDs Characterization

In our previous work^[8], we were able to encapsulate hydrophilic and anionic QDs, CdTe stabilized/functionalized with MPA (mercaptopropionic acid), in fusogenic liposomes (DOPE:DOTAP:DPPE-Rh 1:1:0.1 molar ratio), using a film hydration, followed by freezing and thawing, methodology. Although, we confirmed the encapsulation of the MPA QDs in fusogenic liposomes and their fusion with cell

membranes, the liposomes were not able to deliver QDs freely into cytosol. Images of stem cells or RBCs always showed co-localized red/green fluorescence, for fusogenic liposomes and MPA QDs, respectively. This co-localization showed us that the QDs were always near to membranes, possibly caused by an electrostatic interaction between them, as MPA QDs are negatively charged while the fusogenic liposomes are positive (due to DOTAP).

Thus, with the aim to deliver free QDs into cells, we decided to encapsulate positively charged QDs (CdTe-Cis) to avoid QDs-liposomes electrostatic interactions. Other disadvantage of our previous methodology is that it cannot be used to encapsulate QDs conjugated to biomolecules, since the freezing and thawing cycles, that are required to encapsulation, can be harmful to biomolecules. The sequential freezing can cause denaturation of proteins and QDs bioconjugates will possibly lose their activity during those cycles. Therefore, we decided to test and adapt the ethanol injection method for QDs encapsulation. Results showed that we encapsulated successfully CdTe-MPA and CdTe-MSA (negatively charged QDs) in PC liposomes (data not shown). Based on those results, we proceed with the experiments and also encapsulated positively charged QDs, CdTe-Cis in PC liposomes, as it can be observed in Figure 2.

Fig. 2B shows that PC L-QDs are darker than the empty liposomes, which indicates encapsulation because they are filled with nanocrystals becoming optically dense. The encapsulation for these liposomes was also confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 2A). The same pattern was observed for DOPE:DOTAP and fusogenic liposomes (data not shown).

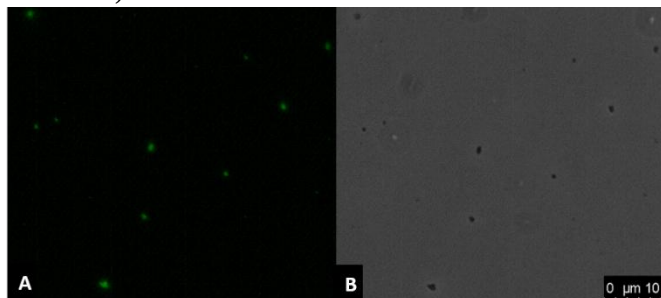


Fig. 2: QDs loaded PC liposomes fluorescence, fluorescence microscopy (A) and phase contrast (B). Bars: 10 μ m.

TEM images also show that QDs were encapsulated into fusogenic liposomes (Fig. 3), as can be observed by darker liposomes (Fig. 3B), due to electron density of QDs, in contrast to the lighter plain liposomes (Fig. 3A).

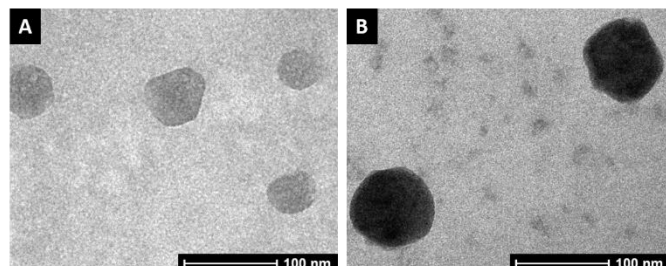


Fig. 3: Plain fusogenic liposomes (A) and loaded QD (B) TEM images.

Results showed us that the injection method was successfully applied to all tested compositions and to different amounts of QDs, such as 30 or 50% of the total volume used for liposomes preparation. Thus, this method presents potential to be a good alternative to accomplish encapsulation of bioconjugated QDs. To our knowledge, there is none report about the encapsulation of hydrophilic QDs in liposomes using the ethanol injection method. In the literature there are only few reports about encapsulation of hydrophilic QDs using thin film hydration^[5], reverse evaporation method^[6] and detergent dialysis^[7].

The injection method produces practically only small unilamellar vesicles (SUVs)^[12], which it was confirmed by DLS results. Plain liposomes showed an average hydrodynamic size of 32 nm for PC, 45 nm for DOPE:DOTAP and approximately 180 nm for DOPE:DOTAP:DPPE-Rh systems. After encapsulation, QDs loaded liposomes presented a higher average hydrodynamic size of 141 nm for PC, 98 nm for DOPE:DOTAP and around 340 nm for fusogenic liposome systems.

The positive charges of the liposomes play an important role for a fusion to be well succeed, because they will be attracted by the cells' membranes negatively charged^[14]. Thus, to know the surface charges of liposomes is a relevant factor to predict the cells-liposomes interactions. Our results showed that unloaded PC liposomes presented a zeta potential around $-(28 \pm 6)$ mV, while the liposomes encapsulating positively charged QDs turns to $+(47 \pm 6)$ mV, which means that the positively charged QDs can be interacting with the surface of these negative liposomes resulting in a final positive total charge. The DOPE:DOTAP liposomes when empty have a zeta potential of $+(47 \pm 13)$ mV (caused by the cationic lipid DOTAP) and when loaded with QDs presented a value of $+(53 \pm 13)$ mV, which shows that there was not significative difference in zeta potential measurements, as expected. The fusogenic plain liposomes presented a zeta potential around $+(50 \pm 5)$ mV and the DPPE-Rh liposomes encapsulating QDs a zeta potential of $+(45 \pm 10)$ mV, values for which it also was not significative difference when compared one to each other. These zeta potential values were obtained for the smaller DOTAP concentration used in the fusogenic liposomes preparation.

3.3. DOTAP Assays

Flow cytometry results showed us that all tested liposomes were able to fuse with RBCs, but when increasing DOTAP concentration it was found that there was more lysis, as shown in Table I. Fig. 4-A shows control RBCs to define the parameters, and Fig. 4-B representative analysis used for characterizing the fusion and the homeostasis. We found that 0.3 mM of DOTAP could be a good ratio for cell delivery QDs tests, as they were able to fuse without considerable damages to the cells. Thus, from now on, it was set the DOTAP ratio of 0.3 mM to the following analysis with cells.

Table I: Different DOTAP ratios and its influence on RBC, in 1 minute of incubation.

DOTAP ratio	Healthy cells (%)	Signal (%)
0.3	99.2	92.7
0.5	98.0	100
0.8	90.4	100
1	88.2	100

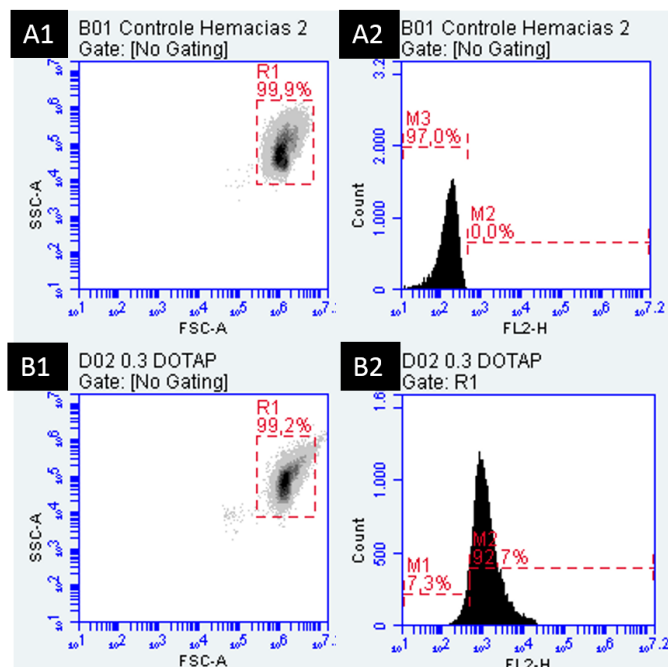


Fig 4: Control RBCs homeostasis (A1) and no fluorescence signal (A2). Representative analysis (B) used for characterizing the homeostasis by the SSC x FSC plot (B1) and the fluorescence signal caused by fusion of DPPE-Rh liposomes with RBCs (B2).

3.4. Cells Fluorescence Microscopy Analysis

To probe the ability of liposomes to fuse, we incubated plain fusogenic liposomes with RBCs (Fig. 5). The results show that the vesicles prepared by the ethanol injection method were able to fuse with the cells and are in agreement to previous works [4, 8].

After validation of the fusion effectiveness, we tested the interaction of QDs loaded liposomes with RBCs. The DOPE:DOTAP liposomes analysis showed that these vesicles were not able to label the cells with QDs, since the

aromatic group presented in the DPPE-Rh is an important factor to trigger the fusion, and consequently the labeling [4]. However, this experiment was also relevant to prove that bare QDs, which could be not removed by the purification process, are not able to label the RBCs.

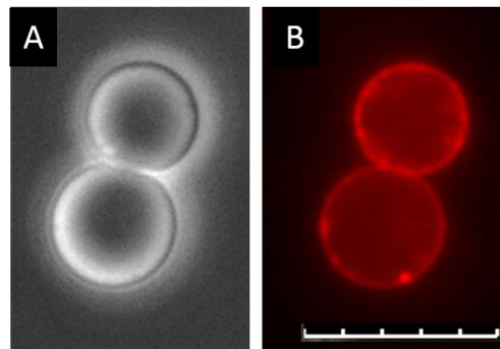


Fig. 5: Plain fusogenic liposomes labeling RBCs, contrast phase (A) and its fluorescence (B). Bar: 10 μ m.

On the other hand, fusogenic liposomes were able to fuse and label not only the RBCs, but also the HeLa cells. From Fig. 6 and Fig. 7, it is possible to observe the fluorescence patterns of QDs and liposomes in green and red, respectively. These results show that the signal of QDs and lipids are not always co-localized, although some yellow fluorescence can also be seen. In ideal conditions, we would expected that the red emission of the DPPE-Rh lipid could be only observed at the cell' membrane and the green signal, due to QDs, preferentially inside the cell, at the cytosol. However, the weak green signal observed without co-localization suggest that they are some free QDs into the cell. Further studies are needed to confirm this suggestion. These results were different from those ones obtained by us in our previous work [8] and show that cationic QDs can be a promising probe for intracellular labeling by using liposomes. As far as we know, this is the first work related to QDs delivery that has used positively charged nanocrystals.

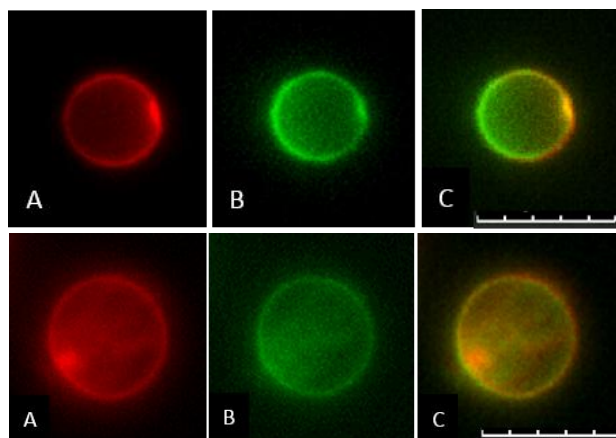


Fig. 6: QDs loaded fusogenic liposomes labeling RBCs, red lipid fluorescence (A), green emitting QDs fluorescence (B) and the overlay (C). Bar: 10 μm .

In HeLa cells (Fig. 7), the signs of intracellular release of QDs were more pronounced. It was possible to differentiate the liposome labeling at the membrane and the QDs labeling inside the cell. In these images we also can see that the liposomes were not endocytosed, once there is no considerable fluorescence from the liposomes inside the cells. QDs exhibit a weak fluorescence probably because there are few and sparse nanocrystals inside the cells. Confocal images and TEM analysis of the cells after L-QDs incubation should be done in order to better confirm these results. To our knowledge, until now, the studies reported in the literature show only membrane labeling by QDs^[5b, 8, 15].

To better observe the QDs fluorescence, in these experiments, we took advantage of the photobleaching of the rhodamine. We also used a smaller concentration of the DPPE-Rh lipid to highlight the QDs emission due to possible energy transfer between the nanocrystals and the fluorescent lipids.

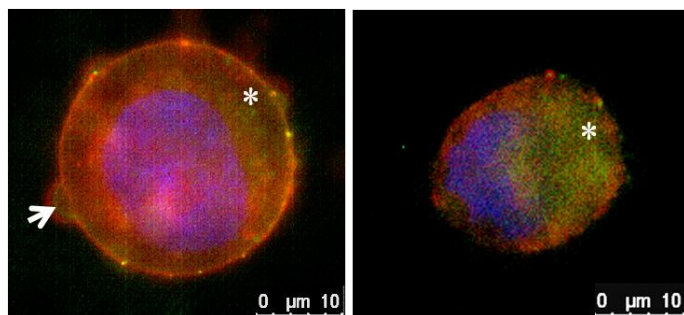


Fig. 7: QDs loaded fusogenic liposomes labeling HeLa cells. The blue fluorescence is from DAPI. The arrow and the asterisks indicate the green QDs fluorescence.

These results are promising because they suggest intracellular delivery. In order to get better scores, some approaches could be tested: (1) use other lipids ratios, (2) change the QDs amount, (3) separate loaded from unloaded liposomes to have more L-QDs interacting with the cells (4) use green lipids and red QDs to avoid possible energy transfer from nanocrystals to liposomes and (5) encapsulate conjugated QDs to target a specific region of the cytosol to enhance and localize their fluorescent signal.

CONCLUSION

We showed that the ethanol injection method was successfully applied to encapsulate hydrophilic QDs independent of the liposome composition. The ethanol injection method presents potential to deliver QDs bioconjugated to biomolecules, because it can be used with proteins without denaturation, increasing the possibilities of performing intracellular studies. The DOTAP

flow cytometry assays showed that it is possible to use lower concentrations of this lipid keeping the fusogenic liposomes's ability and cell homeostasis.

Through the fluorescence microscopy images of RBCs and HeLa cells, it was possible confirm the fusion, evidencing intracellular release of QDs. In some images, we did not observe signs of co-localization while other cells seem to have co-localization. Deeper studies and some improvements on the systems are needed in order to confirm these results.

To our knowledge, there is still none report, which shows free delivery of QDs to cytosol or labeling of organelles by QDs. We hope that this study will help to develop effective improvements in the ethanol injection method for encapsulating and releasing free QDs into cytosol, allowing intracellular labeling of living cells. These improved approaches would help the researches to enjoy of the full potential of QDs as fluorescent probes for better comprehension of intracellular processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the following agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFO) for financial support. Additionally, we would like to thank the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for allowing the use of analytical facilities and Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) for TEM images.

REFERENCES

- [1] Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y., *Science* **2006**, 312 (5771), 217-224.
- [2] [a]Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P., *Science* **1998**, 281 (5385), 2013-2016; [b]Chan, W. C. W.; Nie, S., *Science* **1998**, 281 (5385), 2016-2018; [c]Smith, A. M.; Nie, S., *Analyst* **2004**, 129 (8), 672-677.
- [3] Torchilin, V. P., *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4 (2), 145-160.
- [4] Csiszár, A.; Hersch, N.; Dieluweit, S.; Biehl, R.; Merkel, R.; Hoffmann, B., *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21 (3), 537-543.
- [5] [a]Dudu, V.; Ramcharan, M.; Gilchrist, M. L.; Holland, E. C.; Vazquez, M., *J Nanosci Nanotechnol* **2008**, 8 (5), 2293-2300; [b]Yang, C.; Ding, N.; Xu, Y.; Qu, X.; Zhang, J.; Zhao, C.; Hong, L.; Lu, Y.; Xiang, G., *Journal of Drug Targeting* **2009**, 17 (7), 502-511.
- [6] Chen, C.-S.; Yao, J.; Durst, R., *J Nanopart Res* **2006**, 8 (6), 1033-1038.
- [7] Sigot, V.; Arndt-Jovin, D. J.; Jovin, T. M., *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21 (8), 1465-1472.

- [8] Lira, R. B.; Seabra, M. A. B. L.; Matos, A. L. L.; Vasconcelos, J. V.; Bezerra, D. P.; de Paula, E.; Santos, B. S.; Fontes, A., *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1* (34), 4297-4305.
- [9] Tenório, D. P. L. A.; Andrade, C. G.; Cabral Filho, P. E.; Sabino, C. P.; Kato, I. T.; Carvalho Jr, L. B.; Alves Jr, S.; Ribeiro, M. S.; Fontes, A.; Santos, B. S., *J Photochem Photobiol B Biol* **2015**, *142* (0), 237-243.
- [10] Dagtepe, P.; Chikan, V.; Jasinski, J.; Leppert, V. J., *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (41), 14977-14983.
- [11] Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X., *Chem Mater* **2003**, *15* (14), 2854-2860.
- [12] Batzri, S.; Korn, E. D., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1973**, *298* (4), 1015-1019.
- [13] Filion, M. C.; Phillips, N. C., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1997**, *1329* (2), 345-356.
- [14] [a]Rojanasakul, Y., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, *18* (2), 115-131; [b]Smith, J. G.; Walzem, R. L.; Bruce German, J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1993**, *1154* (3-4), 327-340.
- [15] Gopalakrishnan, G.; Danelon, C.; Izewska, P.; Prummer, M.; Bolinger, P.-Y.; Geissbühler, I.; Demurtas, D.; Dubochet, J.; Vogel, H., *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (33), 5478-5483.

VII – CONCLUSÃO

- Pelo método de hidratação de filme lipídico seguido pelo *freeze-and-thaw* foi possível encapsular com sucesso QDs de CdTe-AMP em lipossomas de PC, PC:DOTAP e a composição fusogênica.
- Os lipossomas fusogênicos contendo QDs foram capazes de marcar as hemácias e células tronco através da fusão. Utilizando a microscopia de fluorescência, a fusão dos lipossomas foi evidenciada pela marcação vermelha da membrana das células e pela fluorescência verde dos QDs.
- A co-localização dos sinais de fluorescência observada nas hemácias e células tronco, formada pela emissão vermelha dos lipídeos e verde dos QDs, indica que tanto os lipídeos quanto os QDs estão espacialmente próximos, provavelmente associados por interação eletrostática.
- Encapsulamos QDs positivos, CdTe-Cis, em três composições lipossomais diferentes, PC, DOPE:DOTAP e DOPE:DOTAP:DPPE-Rh e QDs negativos em PC, através de adaptações realizadas no método de injeção em etanol.
- No estudo da influência do DOTAP na fusão dos lipossomas com as hemácias e na sua homeostase, feito através de citometria de fluxo, pudemos encontrar que a concentração de 0,3 mM foi efetiva na fusão e não foi tão tóxica à célula.
- Através das imagens de microscopia de fluorescência das hemácias e das células HeLa confirmamos a fusão, havendo indícios de liberação intracelular dos QDs. Em algumas microscopias não observamos sinais de co-localização.
- Nesta dissertação, foram utilizados dois métodos distintos de encapsulamento de QDs em lipossomas, o método *freeze-and-thaw* e o de injeção em etanol. Ambos os métodos se mostraram capazes de encapsular QDs hidrofílicos aniônicos, o método de injeção em etanol foi também capaz de encapsular os QDs catiônicos.
- O método de preparo de injeção em etanol permitiu a preparação de lipossomas contendo QDs de forma mais rápida e prática que a metodologia anteriormente utilizada (hidratação de filme lipídico seguido de *freeze-and-thaw*).

VIII – PERSPECTIVAS

Para confirmar se realmente houve entrega livre dos QDs no citosol podem ser feitas outras análises, por exemplo: (1) imagens por microscopia confocal observando nas seções ópticas a fusão e a liberação dos QDs e (2) imagens por microscopia eletrônica de transmissão das células incubadas, onde poderíamos ver os QDs por serem eletro densos.

Talvez, as nanopartículas que entram na célula possam ser mais facilmente evidenciadas se estivessem conjugadas a uma biomolécula e marcassem uma estrutura intracelular, ao invés de estarem dispersas no citosol, aumentando assim o sinal fluorescente do QD em uma região.

Uma outra opção seria realizar uma separação dos lipossomas que encapsularam QDs, dos que não encapsularam, pois garantindo que apenas lipossomas encapsulando QDs possam se fundir às células, teríamos um menor dano pelos lipossomas sem QDs e um aumento na eficiência de entrega das nanopartículas.

O método de injeção em etanol poderá permitir também a encapsulação de QDs conjugados a proteínas sem perda da atividade, o que não era possível anteriormente pelo método de encapsulamento *freeze-and-thaw*, pois no congelamento as proteínas perderiam sua atividade o que deixaria o bioconjugado sem função biológica.

Com o estabelecimento de uma metodologia eficaz para a entrega intracelular de QDs, novas possibilidades de estudo são abertas para usar todo o potencial dos QDs no melhor entendimento de processos intracelulares.

IX – ANEXOS

Normas da revista *Current Nanoscience*

Title: (The Title of the Article should be Precise and Brief and Must Not be More Than 120 Characters. Authors should avoid the Use of Non-Standard Abbreviations. The Title Must be Written in Title Case Except for articles, conjunctions and prepositions.)

Principle Author^a, Corresponding author^{*b}, Co-author¹, Co-author^{2a} and Co-author^{3a}

^aDepartment Name, Faculty Name, University Name, City, Country; ^bDepartment Name, Faculty Name, University Name, City, Country

Abstract: The abstract should not exceed 250 words for review papers summarizing the essential features of the article.

Keywords: Provide 6 to 8 keywords in alphabetical order.

1. INTRODUCTION

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner, for the researchers.

1.1. Section headings

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, etc. A page break may be inserted to keep a heading along with its text.

1.2. General guidelines for the preparation of your text

Please provide soft copies of all the materials (main text in MS Word or Tex/LaTeX), figures/illustrations in TIFF, PDF or JPEG, and chemical structures drawn in ChemDraw (CDX)/ISISDraw (TGF) as separate files, while a PDF version of the entire manuscript must also be included, embedded with all the figures/illustrations/tables/chemical structures etc. It is advisable that the document files related to a manuscript submission should always have the name of the corresponding author as part of the file name, i.e., "Cilli MS text.doc", "Cilli MS Figure 1" etc.

It is imperative that before submission, authors should carefully proofread the files for special characters, mathematical symbols, Greek letters, equations, tables,

references and images, to ensure that they appear in proper format.

References, figures, tables, chemical structures etc. should be referred to in the text at the appropriate place where they have been first discussed. Figure legends/captions should also be provided.

1.3. Figures/Illustrations:

All authors must strictly follow the guidelines below for preparing illustrations for publication. If the figures are found to be sub-standard, then the manuscripts will be rejected/ and the authors offered the option of figure improvement professionally by Eureka Science. The costs for such improvement will be charged to the authors.

Illustrations should be provided as separate files, embedded in the text file, and must be numbered consecutively in the order of their appearance. Each figure should include only a single illustration which should be cropped to minimize the amount of space occupied by the illustration.

If a figure is in separate parts, all parts of the figure must be provided in a single composite illustration file.

Photographs should be provided with a scale bar if appropriate, as well as high-resolution component files.

1.3.1. Scaling/Resolution:

Line Art image type is normally an image based on lines and text. It does not contain tonal or shaded areas. The preferred file format should be TIFF or EPS, with the color mode being Monochrome 1-bit or RGB, in a resolution of 900-1200 dpi.

Halftone image type is a continuous tone photograph containing no text. It should have the preferred file format

*Address correspondence to this author at the Department of xxx, Faculty of xxx, xxx University, P.O. Box: 0000-000, City, Country; Tel/Fax: ++0-000-000-0000, +0-000-000-0000; E-mails: author@institute.xxx

TIFF, with color mode being RGB or Grayscale, in a resolution of 300 dpi.

Combination image type is an image containing halftone, text or line art elements. It should have the preferred file format TIFF, with color mode being RGB or Grayscale, in a resolution of 500-900 dpi.

1.3.2. Formats:

Illustrations may be submitted in the following file formats:

- Illustrator
- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- PNG (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (version 5 and above; figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG (conversion should be done using the original file)
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISISDraw)

Bentham Science does not process figures submitted in GIF format.

For TIFF or EPS figures with considerably large file size restricting the file size in online submissions is advisable. Authors may therefore convert to JPEG format before submission as this results in significantly reduced file size and upload time, while retaining acceptable quality. JPEG is a 'lossy' format, however. In order to maintain acceptable image quality, it is recommended that JPEG files are saved at High or Maximum quality.

Zipit or Stuffit tools should not be used to compress files prior to submission as the resulting compression through these tools is always negligible.

Please refrain from supplying:

- a) Graphics embedded in word processor (spreadsheet, presentation) document.
- b) Optimized files optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG) because of the low resolution.
- c) Files with too low a resolution.
- d) Graphics that are disproportionately large for the content.

1.3.3. Image Conversion Tools:

There are a number of software packages available, many of them freeware or shareware, capable of converting to and from different graphics formats, including PNG.

General tools for image conversion include Graphic Converter on the Macintosh, Paint Shop Pro, for Windows, and ImageMagick, available on Macintosh, Windows and UNIX platforms.

Bitmap images (e.g. screenshots) should not be converted to EPS as they result in a much larger file size than the equivalent JPEG, TIFF, PNG or BMP, and poor quality. EPS should only be used for images produced by vector-drawing applications such as Adobe Illustrator or CorelDraw. Most vector-drawing applications can be saved in, or exported as, EPS format. If the images were originally prepared in an Office application, such as Word or PowerPoint, original Office files should be directly uploaded to the site, instead of being converted to JPEG or another format of low quality.

1.3.4. Color Figures/Illustrations:

Color figures publication in the journal: The cost for each individual page of color figures is US\$ 950.

Color figures should be supplied in CMYK not RGB colors.

1.3.5. Chemical Structures:

Chemical structures MUST be prepared in ChemDraw/CDX and provided as a separate file.

1.4. Construction of references

All references should be numbered sequentially [in square brackets] in the text and listed in the same numerical order in the reference section. The reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Sample references are provided at the end of this template in the reference section. Correct reference format and list must be provided in the article.

2. MATERIALS AND METHOD (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included.

EXPERIMENTAL: (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)-

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS: (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)-

The Results and discussions may be presented individually or combined in a single section with short and informative headings.

CONCLUSION

The concluding lines of the article may be presented in a short section of conclusion.

LIST OF ABBREVIATIONS

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.

CONFLICT OF INTEREST

Financial contributions and any potential conflict of interest must be clearly acknowledged under the heading 'Conflict of Interest'. Authors must list the source(s) of funding for the study. This should be done for each author.

ACKNOWLEDGEMENTS

All individuals listed as authors must have contributed substantially to the design, performance, analysis, or reporting of the work and are required to indicate their specific contribution. Anyone (individual/company/institution) who has substantially contributed to the study for important intellectual content, or who was involved in the article's drafting the manuscript or revising must also be acknowledged.

Guest or honorary authorship based solely on position (e.g. research supervisor, departmental head) is discouraged.

REFERENCES

Journal Reference:

- [1] Bard, M.; Woods, R.A.; Bartón, D.H.; Corrie, J.E.; Widdowson, D.A. Sterol mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: chromatographic analyses. *Lipids*, **1977**, *12*(8), 645-654.
- [2] Zhang, W.; Brombosz, S.M.; Mendoza, J.L.; Moore, J.S. A high-yield, one-step synthesis of o-phenylene ethynylene cyclic trimer via precipitation-driven alkyne metathesis. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 10198-10201.

Book Reference:

- [3] Crabtree, R.H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 3rd ed.; Wiley & Sons: New York, **2001**.

Book Chapter Reference:

- [4] Wheeler, D.M.S.; Wheeler, M.M. In: *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science B. V: Amsterdam, **1994**; Vol. 14, pp. 3-46.

Conference Proceedings:

- [5] Jakeman, D.L.; Withers, S.G.E. In: *Carbohydrate Bioengineering: Interdisciplinary Approaches* In: Proceedings of the 4th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Stockholm, Sweden, June 10-13, 2001; Teeri, T.T.; Svensson, B.; Gilbert, H.J.; Feizi, T., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2002**; pp. 3-8.

URL (WebPage):

- [6] National Library of Medicine. Specialized Information Services: Toxicology and Environmental Health. sis.nlm.nih.gov/Tox/ToxMain.html (Accessed May 23, **2004**).

Patent:

- [7] Hoch, J.A.; Huang, S. Screening methods for the identification of novel antibiotics. U.S. Patent 6,043,045, March 28, 2000.

Thesis:

- [8] Mackel, H. *Capturing the Spectra of Silicon Solar Cells*. PhD Thesis, The Australian National University: Canberra, December **2004**.

E-citations:

- [9] Citations for articles/material published exclusively online or in open access (free-to-view), must contain the accurate Web addresses (URLs) at the end of the reference(s), except those posted on an author's Web site (unless editorially essential), e.g. 'Reference: Available from: URL'.

Some important points to remember:

- All references must be complete and accurate.
- All authors must be cited and there should be no use of the phrase et al.
- Date of access should be provided for online citations.
- Journal names should be abbreviated according to the Index Medicus/MEDLINE.
- Punctuation should be properly applied as mentioned in the examples given above.
- Superscript in the in-text citations and reference section should be avoided.
- Abstracts, unpublished data and personal communications (which can only be included if prior permission has been obtained) should not be given in the references section. The details may however appear in the footnotes.
- The authors are encouraged to use a recent version of EndNote (version 5 and above) or Reference Manager (version 10) when formatting their reference list, as this allows references to be automatically extracted.

