MATHEUS MLOT PALMA

**Desenvolvimento de nanopartículas metal-proteína para a entrega
de DNA em estudos de terapia e vacinação gênicas**

São Paulo

2017

MATHEUS MLOT PALMA

**Desenvolvimento de nanopartículas metal-proteína para a entrega
de DNA em estudos de terapia e vacinação gênicas**

São Paulo

2017

MATHEUS MLOT PALMA

**Desenvolvimento de nanopartículas metal-proteína para a entrega
de DNA em estudos de terapia e vacinação gênicas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química da
Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues
Azzoni

São Paulo

2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Palma, Matheus Mlot

Desenvolvimento de nanopartículas metal-proteína para a entrega de DNA em estudos de terapia e vacinação gênicas / M. M. Palma -- versão corr. - São Paulo, 2017.

91 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Terapia gênica 2.Vetores não virais 3.Nanotecnologia 4.Biotecnologia 5.Proteínas recombinantes I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao professor Adriano Azzoni, por todo o auxílio e iluminação, desde antes do início do Mestrado. O conhecimento, a preocupação e a paciência por ele transmitidos e oferecidos foram essenciais para que este trabalho fosse realizado.

Ao professor Marcelo Seckler, a todas as suas instigações científicas e ao seu enorme apoio como coorientador, também, meu muito obrigado.

Aos meus pais, Antonio e Esther, por todo o suporte e incentivo em mais essa etapa. Se houve duas pessoas que me incentivaram a buscar cada vez mais conhecimento e valorizar uma boa educação e formação, sem dúvidas, foram eles.

À minha namorada, Paula, por toda a paciência, apoio e incentivo nos momentos difíceis, por todo carinho, descontração e cuidado, por todos os momentos, seja para jantar e discutir as dificuldades, seja para tomar um café rápido e esfriar a cabeça, e também por compartilhar o interesse e fascínio pelas novas descobertas que realizei ao longo deste trabalho.

Aos meus dois alunos de Iniciação Científica, Caio e Luísa que foram fundamentais para os primeiros passos do projeto. Sem os questionamentos e ideias deles, com certeza não teríamos ido tão longe.

Aos colegas do GEnBio, Gabriela, Daniela, Sara, Rafael's (Risnik, da Gama), Georges, Bianca, Júlia, Guilherme, Luís, Letícia, Maira, Davi, Juliano, Suzanna, Carla e Livia, e aos colegas do Bloco 22, Frederico, Yuri, Gustavo, Jefferson e Flávia, obrigado por todo o apoio e auxílio, fosse para ensinar um protocolo, fosse para discutir alguma coisa que não estivesse dando certo ou até mesmo para descontrair e tomar um café. Obrigado também à Marianna Favaro e ao Rafael Alves, da Unicamp, que tiveram tanta paciência em me ajudar e ensinar, mesmo de longe.

A todos os professores e técnicos que emprestaram parte do laboratório, algum equipamento ou auxiliaram na utilização dos mesmos: Aldo, Cassius, Idalina, Renata, Orlinda e Andrea. Se não fosse a predisposição deles para oferecer ajuda, mesmo que indiretamente, o trabalho teria sido infinitamente mais complicado.

Aos meus colegas de longa data, Felipe, Guilherme e Khevin, que estão sempre prontos a me ajudar a distrair a cabeça e dar boas risadas quando tudo aparentemente estava complicado demais.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, e também à Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro que contribuiu de diversas maneiras a esta pesquisa.

**“A frase mais animadora de se ouvir na ciência, aquela que anuncia novas descobertas, não é
‘Eureka!’, mas sim ‘Que engraçado...’”**

Isaac Asimov

RESUMO

Um problema recorrente no desenvolvimento de vacinas de DNA e terapia gênica utilizando vetores não virais é a baixa eficiência de transfecção gênica. Isso ocorre devido às diversas barreiras físicas, enzimáticas e difusionais que o DNA precisa superar para chegar ao núcleo das células. Neste trabalho tem-se por objetivo o desenvolvimento de novos vetores não virais de entrega gênica, formados por DNA plasmidial (pDNA), proteínas (protamina ou T-Rp3) e nanopartículas de ouro (NPAu) na forma de complexos ternários. Para tal, NPAu's foram sintetizadas por redução com citrato de sódio, apresentando diâmetros entre 20,3 e 57,3 nm e potencial zeta entre -69,0 e +43,3 mV, dependendo das condições de síntese, a saber, das quantidades de citrato de sódio adicionadas e da ordem de adição dos reagentes. Em seguida, vetores compostos por pDNA-protamina/T-Rp3-NPAu foram formados, transfectados em células HeLa cultivadas *in vitro*, e a atividade da enzima repórter luciferase foi medida. Deste modo, a partir de variações em proporção mássica e tamanho de nanopartículas, foi possível obter complexos utilizando protamina e ouro com uma eficiência de transfecção 33 vezes melhor do que transfecções utilizando apenas protamina. Por outro lado, complexos contendo T-Rp3 e ouro se mostraram ainda mais eficazes na entrega, apresentando níveis de transfecção próximos ao do reagente comercial Lipofectamina. Ensaios de transfecção utilizando a droga nocodazol indicaram a importância dos microtúbulos no mecanismo de entrega gênica, e ensaios com a droga cloroquina evidenciaram que as nanopartículas de ouro atuam de maneira diferenciada no escape endossomal dos vetores não virais utilizados. Visando relacionar características físico-químicas com a eficiência de transfecção, alguns destes complexos foram caracterizados por espalhamento dinâmico de luz, em que complexos com protamina apresentaram tamanhos entre 116 e 363 nm e complexos com T-Rp3 apresentaram entre 135 e 307 nm e potenciais zeta entre +7,3 e +22,5 mV e +10,6 e +27,2 mV, respectivamente, dependendo das características das NPAu's.

Palavras-chave: Terapia gênica; Entrega gênica; Vetores não virais; Nanopartículas de ouro; Proteínas recombinantes; DNA plasmidial.

ABSTRACT

A recurrent problem in the development of DNA vaccines and gene therapy using non-viral vectors is the low efficiency of transfection. That is due to the many physical, enzymatic and diffusional barriers that DNA must overcome to reach the cell nucleus. This work aims to develop novel non-viral vectors based on plasmid DNA (pDNA), proteins (protamine or recombinant T-Rp3) and gold nanoparticles (AuNP) as ternary complexes. For such, AuNP's were first synthesized via sodium citrate reduction, with diameters varying from 20,3 to 57,3 nm and zeta potentials between -69,0 and +43,3 mV, depending on synthesis conditions, changing the quantities of sodium citrate added and the order of addition of reagents. Vectors formed by pDNA-protamine/T-Rp3-AuNP were then formed, transfected and luciferase activity was measured. Thus, from variations on mass ratios and gold nanoparticle sizes, it was possible to obtain complexes with protamine and gold with a transfection efficiency 33 times higher than analog complexes using only protamine. Also, complexes containing T-Rp3 and gold showed an even higher delivery efficiency, with transfection efficiency close to Lipofectamine. Assays using nocodazole indicated the importance of microtubule in the gene delivery process and, whereas assays with chloroquine showed that gold nanoparticles act in a different way over endosomal escape of used non-viral vectors. Finally, some of these complexes were characterized with dynamic light scattering. Complexes with protamine were within the size range of 116 to 363 nm and complexes with T-Rp3 were within the size range of 135 to 307 nm. The zeta potential varied from +7,3 to +22,5 mV and from +10,6 to +27,2 mV, respectively, depending on the gold nanoparticles used.

Keywords: Gene therapy; Gene delivery; Non-viral vectors; Gold nanoparticles. Recombinant proteins; Plasmid DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de distribuição de testes clínicos de terapia gênica realizados por pais (EDELSTEIN, 2016).	20
Figura 2 - Gráfico de distribuição de doenças tratadas em testes clínicos de terapia gênica. Adaptado de EDELSTEIN, 2016.....	21
Figura 3 - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação por nucleases extracelulares; (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação no endossoma; (5) escape do endossoma; (6) degradação por nucleases citosólicas; (7) entrada no núcleo; (8) transcrição; (9) exportação do mRNA; (10) tradução (ALVES, 2014).....	25
Figura 4 - Esquema ilustrativo da distribuição funcional da proteína T-Rp3 desenvolvida por Favaro et. al (2014). A proteína contém uma cauda de histidina (representada em azul), a sequência de ligação com DNA (verde), a cadeia leve de dineínas Rp3 (laranja) e a sequência do peptídeo membrano-ativo TAT (vermelho).	33
Figura 5 - Esquema de distribuição de contra-íons sobre a superfície de uma partícula em suspensão coloidal, apresentando as camadas elétricas formadas, bem como o potencial elétrico em função da distância da superfície da partícula. Adaptado de KASZUBA, CORBETT, et al., 2010.....	39
Figura 6 - Coloração da solução ao longo do tempo, evidenciando a formação das nanopartículas de ouro, da esquerda para a direita, aos 1, 7 e 15 minutos após a adição da solução de citrato de sódio.	44
Figura 7 – Mapa do plasmídeo modelo pVAX1Luc, utilizado nos ensaios deste trabalho.	47
Figura 8 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com diferentes quantidades de citrato de sódio. À esquerda, NPAu's sintetizadas com 2,8:1 em relação molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III). À direita, utilizando 13,4:1 de relação molar.	54
Figura 9 - Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelada por brometo de etídio. (1): marcador de massa molecular de DNA 1 kb (New England Biolabs) (com seus respectivos calores de interesse apresentados à esquerda); (2): pVAX1Luc (4,6 kpb) purificado.....	60

Figura 10 - SDS-PAGE (13,5%) de diferentes eluições da coluna Ni-NTA durante a purificação da T-Rp3 por cromatografia de afinidade. (1): controle positivo de proteína T-Rp3 previamente purificada; (2): extrato proteico obtido após a sonicação da E. coli; (3): fração de eluição de extrato proteico; (4) fração de eluição com tampão de extração; (5): fração de eluição com 20 mM de Imidazol em tampão de extração; (6) fração de eluição com 50 mM de Imidazol; (7) fração de eluição com 75 mM de Imidazol; (8): fração de eluição com 500 mM de Imidazol, sendo a banda relativa a T-Rp3 indicada por uma seta.....61

Figura 11 - Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelada por brometo de etídio de complexos binários formados por pVAX1Luc e protamina. Na parte superior da imagem, apresentam-se as razões mássicas pDNA:protamina utilizadas para cada complexo.62

Figura 12 – Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) de complexos binários formados por pVAX1Luc e T-Rp3. Na parte superior da imagem, apresentam-se as razões mássicas pDNA:T-Rp3 utilizadas para cada complexo.63

Figura 13 - Eficiência de transfecção de células HeLa utilizando vetores não virais formados por pDNA-Protamina-NPAu, variando as proporções mássicas dos complexos ternários (indicadas abaixo do eixo x) e o diâmetro das nanopartículas de ouro (indicados abaixo das proporções). Controles sem transfecção, transfectados com pDNA nu, Lipofectamina e complexos binários pDNA-Protamina também são apresentados. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas realizadas.65

Figura 14 - Eficiência de transfecção de células HeLa utilizando vetores não virais formados por pDNA-T-Rp3-NPAu, variando as proporções mássicas dos complexos ternários (indicadas abaixo do eixo x) e o diâmetro das nanopartículas de ouro (indicados abaixo das proporções). Controles sem transfecção, transfectados com pDNA nu, Lipofectamina e complexos binários pDNA-T-Rp3 também são apresentados. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas realizadas.68

Figura 15 - Ensaio de transfecção de complexos binários (pDNA:T-Rp3) ou ternários (pDNA:T-Rp3:NPAu) utilizando a droga cloroquina, com o objetivo de analisar o envolvimento dos endosomas na eficiência de entrega gênica. As proporções mássicas pDNA:T-Rp3:NPAu, bem como o tamanho das nanopartículas utilizadas estão indicadas abaixo das legendas de controle ou presença da droga. As barras de

erro representam o desvio padrão do experimento realizado em triplicata. O sinal * indica que os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....71

Figura 16 - Ensaio de transfecção de complexos binários (pDNA:T-Rp3) ou ternários (pDNA:T-Rp3:NPAu) utilizando a droga nocodazol, com o objetivo de analisar o envolvimento dos microtúbulos na eficiência de entrega gênica. As proporções mássicas pDNA:T-Rp3:NPAu, bem como o tamanho das nanopartículas utilizadas estão indicadas abaixo das legendas de controle ou presença da droga. As barras de erro representam o desvio padrão do experimento realizado em triplicata. O sinal * indica que os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Turkevich et al. (1951), chamado neste caso de “ordem de adição direta”, variando-se a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III). Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de amostragem.	52
Tabela 2 - Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Turkevich et al. (1951) (“ordem de adição direta”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III) utilizada. Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.	55
Tabela 3 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011) (chamado neste caso de “ordem de adição inversa”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III) utilizada. Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.	56
Tabela 4 - Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011) (chamado neste caso de “ordem de adição inversa”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III). Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.	58
Tabela 5 - Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade de complexos ternários pDNA-protamina-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.	75
Tabela 6 – Potencial Zeta de complexos ternários pDNA-protamina-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.....	76
Tabela 7 - Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade de complexos ternários pDNA-T-Rp3-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.	77

Tabela 8 - Potencial Zeta de complexos ternários pDNA-T-Rp3-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.....79

Tabela 9 - Tabela comparativa de ANOVA entre os pares de complexos pDNA:T-Rp3:NPAu. As células que contém um * indicam que a eficiência de transfecção relativa ao par linha e coluna dos complexos é estatisticamente significativa ao nível de 5%.88

Tabela 10 - Dados de atividade de luciferase (RLU/mg) não normalizados em relação ao controle de ensaios na presença e ausência de cloroquina e nocodazol. A proporção mássica refere-se ao complexo pDNA-T-Rp3-NPAu.89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. TERAPIA E VACINAÇÃO GÊNICA.....	17
2.2. VETORES VIRAIS E NÃO VIRAIS.....	22
2.3. BARREIRAS CELULARES NA ENTREGA GÊNICA REALIZADA POR VETORES NÃO VIRAIS	25
2.4. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VETORES NÃOVIRAIS.....	30
2.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE NANOPARTÍCULAS E SUA INFLUÊNCIA NA ENTREGA GÊNICA.....	37
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
4.2. TRANSFORMAÇÃO DE E. COLI E EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	46
4.3. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE T-Rp3.....	48
4.4. FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS pDNA- PROTAMINA/T-Rp3-NPAu	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. SÍNTESE DE NPAu's.....	52
5.2. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	59
5.3. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE T-Rp3.....	60
5.4. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO EM GEL DE AGAROSE DE COMPLEXOS BINÁRIOS pDNA-PROTEÍNA.....	61

5.5. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO DE COMPLEXOS pDNA:PROTEÍNA:NPAu.....	64
5.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS TERNÁRIOS pDNA-PROTEÍNA-NPAu	74
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. ANEXOS.....	88

1. INTRODUÇÃO

A terapia gênica é uma tecnologia promissora em que se busca a introdução de um ou mais genes de interesse em células de um paciente, de modo a corrigir um defeito, tratar uma doença, ou gerar uma resposta imunológica, no caso das chamadas vacinas gênicas (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Para tal, faz-se necessário o uso de vetores ou carreadores do material genético de interesse, uma vez que o DNA, nu, apresenta baixa capacidade de internalização celular e transporte até o núcleo (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006).

Os vetores de entrega gênica podem ser divididos em dois grupos: virais e não virais. Os primeiros contam com as características inerentes aos vírus, apresentando alta eficiência de entrega. No entanto, o alto custo de produção, bem como as questões de segurança envolvidas, principalmente no que tange a respostas imunológicas causadas, são desvantagens que tornam necessária a busca por novas alternativas (NAYEROSSADAT, MAEDEH e ALI, 2012). Nesse contexto, vetores não virais, baseados em associações entre o DNA e outros componentes adjuvantes facilitadores do transporte celular, tais como proteínas, nanopartículas metálicas, lipossomas e polímeros, surgem como alternativa promissora. No entanto, as diversas barreiras físicas e químicas existentes entre o exterior da célula e o interior do núcleo diminuem a eficiência de entrega destes vetores (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006).

Entre as ferramentas utilizadas como facilitadores da entrega gênica, destacam-se neste trabalho as proteínas, de caráter recombinante ou não, e as nanopartículas metálicas, em especial as de ouro, numa tentativa de unir as suas diferentes vantagens em um único vetor.

As proteínas, quando utilizadas para este fim, geralmente apresentam capacidade de ligação e condensação do DNA, garantindo características importantes para uma maior facilidade de entrega, como tamanho e carga elétrica favoráveis (KIM, PROVODA e LEE, 2015). Além disso, a versatilidade das proteínas recombinantes permite utilizar diversas ferramentas de entrega em um único componente. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido e avaliado diversas proteínas recombinantes especificamente desenhadas para entrega gênica, ativando

mecanismos celulares específicos e simulando mecanismos presentes em vetores virais (TOLEDO, JANISSEN, *et al.*, 2012; TOLEDO, FAVARO, *et al.*, 2013; FAVARO, TOLEDO, *et al.*, 2014).

Adicionalmente, nanopartículas de ouro vem sendo empregadas em diversos campos de aplicação biológica, devido, principalmente, às suas propriedades físicas diferenciadas e biocompatibilidade (SANDHU, MCINTOSH, *et al.*, 2007). Nanopartículas de ouro podem ser sintetizadas em diferentes tamanhos, geometrias e cargas superficiais, que permitem, por exemplo, o carregamento de grandes quantidades de drogas, com excelente biocompatibilidade e facilidade de bioconjugação (KHAN, RASHID, *et al.*, 2014). No caso da terapia gênica, especificamente, elas podem auxiliar na entrega de DNA, por serem naturalmente internalizadas pelas células e protegerem DNA e proteínas de degradações por nucleases e proteases (DELONG, CILLESSEN, *et al.*, 2012; PARVEEN, MISRA e SAHOO, 2012; SPERLING, GIL, *et al.*, 2008; CAPEK, 2015). Citada anteriormente, a facilidade de síntese é interessante, também, por permitir que simples modificações no processo gerem nanopartículas com diferentes características, como tamanho, estabilidade, carga elétrica e revestimento de superfície. Deste modo, além do puro e simples uso desta ferramenta na formação de um vetor não viral, faz-se interessante também investigar se melhorias na eficiência de entrega gênica podem decorrer do uso de nanopartículas de ouro com estas diferentes características, além de se levantar informações relativas aos mecanismos de entrada e tráfego intracelular dos transgenes.

Neste contexto, pouco se conhece atualmente sobre a possibilidade de conjugação de proteínas e de nanopartículas de ouro visando à entrega de DNA para células de mamífero. Caso possível, faz-se interessante buscar quais vantagens podem ser obtidas combinando proteínas e nanopartículas com diferentes características visando a uma maior eficiência de entrega gênica, correlacionando-se características físico-químicas destes complexos com a eficiência e, se possível, com os mecanismos biológicos envolvidos no processo de entrega.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TERAPIA E VACINAÇÃO GÊNICA

A terapia gênica pode ser definida, em termos gerais, como a introdução de um gene em uma célula hospedeira de modo a corrigir um problema genético ou desacelerar o avanço de uma doença. A partir deste conceito, podemos definir seus dois princípios básicos: substituir ou corrigir um gene, visando assim ao reestabelecimento do funcionamento celular; ou então inativar um gene que cause alguma doença a ser tratada (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Idealmente, para que a terapia ocorra com sucesso, deve ser feita através de vetores de entrega gênica que realizem o processo de maneira biodegradável, atóxica, com imunogenicidade controlável, que seja estável durante e após administração, capaz de atingir a célula-alvo e apresentar adequada expressão gênica (HUANG, HUNG e WAGNER, 1999).

A terapia gênica engloba também o conceito de vacinação gênica. Neste caso, a transferência gênica tem como objetivo possibilitar a produção de uma proteína de interesse (antígeno) no próprio organismo submetido ao tratamento, gerando assim uma resposta imune diferenciada em relação às vacinas tradicionais (Norwegian Biotechnology Advisory Board, 2013).

Em comparação com as vacinas convencionais, a vacinação gênica apresenta vantagens e desvantagens. Entre os pontos positivos, podemos citar o fato de serem mais baratas, fáceis de produzir e manusear, além de muitas vezes apresentarem maior estabilidade de armazenamento e transporte. Além disso, tendem a ser seguras, principalmente devido ao fato de poder provocar respostas imunes focadas apenas no antígeno de interesse. Por outro lado, a imunogenicidade pode ser mais fraca se comparada às vacinas tradicionais, além do risco causado pela inserção de DNA estranho ao hospedeiro, que pode tornar a célula-alvo tumoral devido à mutagênese insercional, uma desvantagem que só pode ser identificada a longo prazo, dificultando a previsão de um de seus maiores problemas (KHAN, 2013; SASAKI, TAKESHITA, *et al.*, 2003).

A história da terapia gênica tem início durante as décadas de 70 e 80, quando se iniciam estudos diversos no intuito de desenvolver tecnologias seguras e eficientes de transferência gênica, além daqueles que buscavam compreender as bases patológicas e biológicas referentes às escolhas de possíveis doenças e células-alvo da promissora terapia (BLEASE, CULVER, *et al.*, 1995; WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013).

Os primeiros testes clínicos aprovados ocorreram durante o início dos anos 90 (WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013). O primeiro teste de transferência gênica se deu em 1990, quando Steven A. Rosenberg usou técnicas de marcação gênica com o objetivo de rastrear os movimentos de linfócitos infiltrantes em tumores (TIL) contendo interleucina-2 de pacientes com câncer (ROSENBERG, AEBERSOLD, *et al.*, 1990). Deste modo, considerando os resultados anteriores em que foi comprovado que estas células regrediam melanoma metastático (ROSENBERG, PACKARD, *et al.*, 1988), foi possível verificar a distribuição e sobrevivência das células TIL *in vitro*, extraíndo tais células dos pacientes, modificando-as de modo a inserir um gene de resistência à neomicina através da transferência gênica e reinserindo-as de volta (ROSENBERG, AEBERSOLD, *et al.*, 1990).

Contudo, os primeiros testes realizados por Rosenberg não continham nenhuma proposta de terapia (os testes em que foram comprovados que os tumores não cresciam no local em que eram injetadas as TIL contendo interleucina-2 só foram publicados em 1993, sendo estes, portanto, de caráter terapêutico) (WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013; ROSENBERG, ANDERSON, *et al.*, 1993), sendo Michael Blaese o primeiro a conduzir um teste clínico utilizando um gene terapêutico (WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013). Em 1990, foi aprovado nos Estados Unidos o tratamento gênico para duas crianças com imunodeficiência severa combinada devido à deficiência de adenosina deaminase (ADA-SCID). Neste estudo, genes da adenosina-desaminase (ADA) foram transferidos para células T das crianças utilizando vetores retrovirais. O tratamento enzimático com polietilenoglicol combinado com ADA bovina (que apresenta bons resultados no objetivo de diminuir infecções, mas não uma reconstituição imune completa) pode ser reduzido pela metade nos dois pacientes, possibilitado por uma melhora nas suas funções imunes, causado pela terapia. Após dois anos de tratamento, este foi finalizado e, ainda assim, o vetor continuou integrado e a expressão do gene nas células persistiu. Apesar da principal preocupação de, em longo prazo, os vetores retrovirais causarem

mutagênese insercional, a curto e médio prazo, foi possível provar a potencial eficácia do tratamento para esta doença específica, bem como para uma grande variedade de outras herdadas ou adquiridas (BLEASE, CULVER, *et al.*, 1995).

Após os primeiros resultados obtidos por Blaese, iniciaram-se também testes clínicos na União Européia e a terapia gênica passou por um enorme crescimento no número de testes e estudos, impulsionado por suas promessas (WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013). Em 1999, no entanto, o jovem Jesse Gelsinger, faleceu aos 18 anos, sendo o primeiro caso de morte relacionado à terapia gênica. Gelsinger sofria de deficiência de ornitina transcarbamilase, uma doença rara, porém controlável caso o diagnosticado se submeta a uma dieta com baixa quantidade de proteínas e faça uso de medicamentos diversos. No entanto, o jovem, ainda assim, se submeteu ao teste clínico que usava adenovírus como vetor de entrega, mesmo sabendo que o objetivo do estudo era tratar recém-nascidos com uma forma fatal da doença. Mesmo após testes com ratos, macacos e babuínos, que receberam a mesma dose de adenovírus que o garoto, o organismo de Jesse Gelsinger passou por uma reação em cadeia a partir de sua resposta imune ao vetor, o que o levou à falência múltipla de órgãos (STOLBERG, 1999).

Apesar de alguns poucos casos desfavoráveis, a terapia gênica segue se desenvolvendo e hoje é possível traçar um panorama bem definido de seus estudos ao redor do mundo, com mais de 2400 testes clínicos já realizados. A partir do início dos anos 2000, cerca de 100 testes envolvendo terapia gênica foram realizados anualmente, sendo que em 2015 atingiu-se o pico de 167 testes (os números completos de 2016 ainda não foram publicados). Os Estados Unidos lideram os países que desenvolvem e estudam tal tecnologia, realizando mais que o dobro de testes em toda a Europa, como pode ser observado na Figura 1. O Brasil, no entanto, ainda não apresentou nenhum estudo clínico até o momento (EDELSTEIN, 2016).

Figura 1 - Gráfico de distribuição de testes clínicos de terapia gênica realizados por país (EDELSTEIN, 2016).

Quanto aos alvos da terapia gênica, apesar das inúmeras possibilidades oferecidas, os estudos se concentram em doenças específicas, mas que atingem a maior parte da população. A Figura 2 ilustra a distribuição das doenças que tentam ser tratadas em protocolos clínicos até julho de 2015. Câncer é o caso mais estudado, com 64% dos testes realizados, sendo a terapia gênica aplicada aos mais diversos tipos, incluindo pulmão, de pele, tumores gastrointestinais, entre outros. Esta doença tem sido o foco de trabalho da maioria das pesquisas sobre o assunto principalmente devido às possibilidades de inserção de genes como o p53 (gene de adenovírus recombinante supressor de tumor de percentil 53) (GINN, ALEXANDER, *et al.*, 2013; MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Além do câncer, a terapia gênica também vem mostrando resultados interessantes para diversas outras doenças, principalmente, amaurose congênita de Leber, β -talassemia, a anteriormente citada ADA-SCID, hemofilia B, síndrome de Wiskott-Aldrich e imunodeficiência severa combinada ligada ao gene X (SCID-X1) (WIRTH, PARKER e YLÄ-HERTTUALA, 2013; XU, TAILOR e GRUNEBAUM, 2017; HORAVA e PEPPAS, 2017).

Figura 2 - Gráfico de distribuição de doenças tratadas em testes clínicos de terapia gênica. Adaptado de EDELSTEIN, 2016.

Apesar do crescente número de testes clínicos, atualmente a terapia gênica apresenta uma baixa expressividade no mercado farmacêutico. Até o momento, apenas três produtos foram aprovados para comercialização. Em 2003, a China se tornou o primeiro país a aprovar um medicamento para terapia gênica, chamado Gendicine e comercializado pela Shenzhen Sibiono GeneTech, que consiste de um adenovírus contendo um gene para tratamento de tumores na cabeça e pescoço (PEARSON, JIA e KANDACHI, 2004). Em 2012, na União Europeia, um segundo produto foi aprovado. Chamado Glybera, este medicamento é um vetor viral adeno-associado que foi desenvolvido com o objetivo de expressar a lipoproteína lipase, tratando pacientes que sofrem da deficiência desta proteína (YLÄ-HERTTUALA, 2012). Por fim, o Strimvelis desenvolvido pela GlaxoSmithKline, focado no tratamento de ADA-SCID, aprovado em 2016 na mesma região (REGALADO, 2016). Além desses, novos protocolos de terapia e vacinação gênica continuam a serem estudados, como o sucesso recentemente demonstrado em ensaios pré-clínicos por uma vacina gênica contra o vírus da Zika (LAROCCA, ABBINK, *et al.*, 2016).

A medicina veterinária, por outro lado, apresenta um crescente e mais expressivo desenvolvimento no que diz respeito a produtos deste tipo, sendo aplicada desde animais domésticos até gado (REDDING e WEINER, 2009). Com destaque para as vacinas de DNA, esta técnica se mostra em constante estudo devido às possibilidades de diminuições drásticas de doenças infecciosas, além de diminuir significativas perdas e permitir estratégias de diferenciação de animais infectados e

vacinados, que são de extrema importância para a erradicação de certas doenças e para evitar a inserção certas patogenias em regiões livres desses casos (KYRIAKIS, 2015). Como exemplos de produtos já licenciados, temos a vacina contra o vírus do Oeste do Nilo, desenvolvida para uso em cavalos, uma doença que afetou 15.000 equinos nos Estados Unidos em 2002 (DAVIDSON, TRAUB-DARGATZ, *et al.*, 2005) e a vacina para tratamento de melanoma em cães, sendo a primeira terapia imunocelular licenciada para tratamento de câncer (BERMAN, CAMPS-PALAU, *et al.*, 2006; KUTZLER e WEINER, 2008). Outro produto comercial que merece destaque é a vacina de DNA baseada em um plasmídeo contendo um gene que codifica o hormônio de liberação do hormônio de crescimento em suínos. Esta vacina apresentou interessantes resultados, uma vez que, além de diminuir doenças associadas com o *Mycoplasma hyopneumoniae* e síndromes respiratórias e reprodutivas por infecção viral, diminuiu a mortalidade dos animais e permitiu um aumento no número de filhotes em uma ninhada (THACKER, HOLTKAMP, *et al.*, 2006).

Os avanços obtidos na medicina veterinária envolvendo vacinas de DNA servem, além de tudo, como incentivadores para a continuidade dos estudos em humanos, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento de novos estudos clínicos. Os produtos supracitados com aplicação em suínos e cães, por exemplo, sugerem que, com determinadas e corretas modificações, será possível o surgimento de novos medicamentos para análogos humanos (KUTZLER e WEINER, 2008).

2.2. VETORES VIRAIS E NÃO VIRAIS

Para que os resultados desejados na terapia gênica sejam possíveis, isto é, o transporte do material genético em quantidades suficientes para a sua expressão pela célula de interesse, faz-se necessário, principalmente, escolher e desenvolver um vetor de entrega gênica corretamente (NIIDOME e HUANG, 2002). Para isso, é necessário superar as dificuldades encontradas no transporte dos ácidos nucleicos para o interior das células, o que torna os vetores de entrega gênica sistemas muitas vezes complexos e sofisticados (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006).

Além disso, a expressão gênica ocorrerá somente quando o DNA de interesse for transportado para o interior do núcleo, de maneira eficiente e segura (BROWN, SCHÄTZLEIN e UCHEGBU, 2001).

De maneira geral, os vetores de entrega gênica podem ser divididos em duas categorias: vetores virais e não virais. Os vetores virais consistem de vírus modificados geneticamente de modo a conter o gene de interesse, podendo conter parte ou toda a sequência codificadora viral substituída pela de interesse à terapia gênica (HUANG, HUNG e WAGNER, 1999; MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Os vetores não virais (ou sintéticos), são formados pelo material genético de interesse (geralmente DNA plasmidial) nu ou associado a algum agente facilitador da entrega (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008).

Os vetores virais são atualmente o método de entrega gênica mais utilizado em protocolos clínicos. Estes vetores contam com a vantagem de possuírem características inerentes de infecção para introduzir o material genético nas células-alvo, garantindo, deste modo, uma transfecção mais eficiente que os outros vetores (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Essa facilidade natural de "transdução" do material genético é a característica que torna os vetores virais a principal ferramenta de terapia gênica atualmente (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006).

Apesar dos aspectos positivos, cada vez mais questionamentos são feitos acerca das desvantagens do uso de vírus como vetores de entrega gênica. Problemas relacionados à limitação dos tamanhos dos genes carregados, bem como a dificuldade e custo de produção, feita em células de mamífero, são alguns dos problemas que impedem avanços nas aplicações de terapia gênica (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008). Além disso, o mais crítico dos problemas envolvendo estes tipos de vetores leva em consideração questões de segurança (CHIRA, JACKSON, *et al.*, 2015). Algumas vezes, o uso dos vetores virais pode desencadear reações no sistema imunológico que podem levar a morte (STOLBERG, 1999; NAYEROSSADAT, MAEDEH e ALI, 2012). Além disso, ainda há a possibilidade menos drástica de, após a injeção do vírus, o sistema imune responder de forma a destruir o vetor e impedir a produção da proteína de interesse (FERBER, 2001). Outra possibilidade que pode ocorrer durante os tratamentos com vetores virais é a mutagênese insercional, isto é, quando a informação genética de um organismo é modificada, com silenciamento ou ativação de genes (algumas vezes oncogenes)

devido à inserção de material genético no cromossoma (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006).

Devido aos problemas apresentados, os vetores não virais surgem como uma alternativa interessante aos vetores virais. Suas principais vantagens são a maior segurança e menor custo (RAMAMOORTHY e NARKEVAR, 2015), além de baixa imunogenicidade, toxicidade e maior facilidade de produção em larga escala (HUANG, HUNG e WAGNER, 1999). Apresentam também a vantagem de serem mais baratos e de serem capazes de carregar DNA sem a limitação de tamanho (NAYEROSSADAT, MAEDEH e ALI, 2012). Adicionalmente, desenvolvimentos vem sendo feitos de forma que as características químicas e biológicas do vetor garantam especificidade celular, enquanto novos procedimentos físicos proporcionam precisão espacial (AL-DOSARI e GAO, 2009). Especificamente, vetores não virais, em sua maioria, utilizam DNA plasmidial como carreadores da informação gênica, permitindo a produção deste em larga escala a partir do cultivo de células bacterianas (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2008).

Apesar de serem cada vez mais aceitos como a solução dos problemas causados pelos vetores virais, os vetores sintéticos precisam ainda superar alguns obstáculos. O principal problema dos vetores não virais é a sua baixa eficiência se comparado aos virais (NAYEROSSADAT, MAEDEH e ALI, 2012). Enquanto os vírus apresentam características inerentes para a internalização celular, é necessário que os vetores não virais sejam projetados de modo a conter diversas ferramentas e soluções para estas barreiras que encontrarão durante o processo de entrega gênica, (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, *et al.*, 2006) (Figura 3). No entanto, avanços vem sendo feitos com o objetivo de criar vetores não virais que apresentem níveis de expressão próximos aos virais. Desde 2004, o uso de vetores não virais mostra um crescimento em números de protocolos clínicos, enquanto os vetores virais apresentam significativa diminuição (RAMAMOORTHY e NARKEVAR, 2015).

Figura 3 - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação por nucleases extracelulares; (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação no endossoma; (5) escape do endossoma; (6) degradação por nucleases citosólicas; (7) entrada no núcleo; (8) transcrição; (9) exportação do mRNA; (10) tradução (ALVES, 2014).

2.3. BARREIRAS CELULARES NA ENTREGA GÊNICA REALIZADA POR VETORES NÃO VIRALIS

2.3.1. Internalização celular: associação com a membrana e endocitose

A entrada na célula é a primeira de muitas etapas que definirão a eficiência de entrega gênica (FERRER-MIRALLES, VÁZQUEZ e VILLAVERDE, 2008). Antes de chegar à membrana celular, no entanto, o vetor já enfrenta fenômenos que dificultam a entrega. A presença de nucleases no ambiente extracelular causa uma rápida degradação dos plasmídeos utilizados. Além disso, moléculas endógenas carregadas negativamente, como albumina e outras proteínas do sangue, competem com o DNA para se ligar aos complexos carregados positivamente (WIETHOFF e MIDDAUGH, 2003).

Outra etapa importante nos primeiros passos para superar as barreiras celulares é a associação do DNA com a célula, sendo a transposição da membrana celular uma das mais importantes para se obter uma transfecção eficiente (AL-DOSARI e GAO, 2009; EL-SAYED, FUTAKI e HARASHIMA, 2009). A interação entre a membrana celular e o pDNA nu geralmente é fraca devido à repulsão de cargas negativas presentes em ambos, fazendo-se necessário o uso de carreadores que garantam ao complexo pDNA-carreador uma carga positiva, facilitando essa associação (WIETHOFF e MIDDAGH, 2003). A carga de um complexo, sendo positiva, induz prontamente a adsorção pela membrana. No entanto, desta forma, não é possível que haja especificidade, de modo a garantir que apenas um tipo de célula ou tecido alvo seja transfectado. Além disso, com a exceção de certos fagócitos, o tamanho dos complexos é limitado, uma vez que as células não conseguem internalizar eficientemente partículas muito maiores que 500 nm de diâmetro (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, et al., 2006).

Geralmente, ácidos nucleicos não atravessam a membrana celular sem esta etapa ter sido facilitada pela criação de buracos transientes, feitos por meio físicos como a eletroporação, ou por mecanismos celulares próprios, principalmente a endocitose (FERRER-MIRALLES, VÁZQUEZ e VILLAYERDE, 2008; DE GARIBAY, 2016). Uma vez internalizada por esse mecanismo, a primeira barreira que o vetor não viral irá encontrar é o próprio endossoma (MASTROBATTISTA, VAN DER AA, et al., 2006). Apesar de a endocitose ser um mecanismo importante por permitir a internalização celular, os vetores não virais ficam sujeitos ao pH ácido dentro destas vesículas e também às enzimas digestivas (nucleases e proteases) dos lisossomos, podendo ser degradados. É interessante, portanto, que modificações no vetor sejam feitas de modo a garantir mecanismos de escape endossomal, tais como a utilização de peptídeos membrano-ativos em sua composição, que facilitem a transposição das membranas endossomais (AL-DOSARI e GAO, 2009; EL-SAYED, FUTAKI e HARASHIMA, 2009).

2.3.2. Tráfego intracelular: transporte através do citossol e os microtúbulos

Após o escape endossomal, o vetor não viral se encontra então no citossol, precisando atravessá-lo para que seja possível chegar à última etapa do processo de entrega gênica, a chegada ao núcleo (WIETHOFF e MIDDAUGH, 2003). Caso ocorra uma liberação precoce do DNA por parte do carreador após o escape, o material genético ficará sujeito à ação das nucleases presentes no meio, sendo degradado entre uma ou duas horas (LECHARDEUR, SOHN, *et al.*, 1999). Mais uma vez, portanto, é necessária a ação protetora contra nucleases do carreador, mantendo o material genético condensado e seguro contra a degradação (VÁZQUEZ, FERRER-MIRALLES e VILLAYERDE, 2008).

Outro problema enfrentado na entrega gênica por vetores não virais que se encontram no citossol é a sua difusividade. Até chegar ao núcleo da célula, a informação genética precisa atravessar uma considerável distância em um ambiente cuja mobilidade é extremamente dificultada devido à presença da rede citoesquelética (VÁZQUEZ, FERRER-MIRALLES e VILLAYERDE, 2008). No entanto, ao mesmo tempo que o citoesqueleto dificulta a difusividade de maneira livre, endossomos e lisossomos, por exemplo, usam mecanismos motores ligados a essa estrutura, para se locomover até o núcleo (VÁZQUEZ, FERRER-MIRALLES e VILLAYERDE, 2008). Ou seja, deve-se considerar a importância dos citoesqueletos, uma vez que eles, mediados por motores moleculares, são ferramentas que possibilitam a mobilidade de vesículas e outras cargas ao longo de si mesmos (MEDINA-KAUWE, XIE e HAMM-ALVAREZ, 2005).

Dentre essas estruturas citoesqueléticas utilizadas para transporte, convém ressaltar o papel dos microtúbulos (MT) (LEOPOLD e PFISTER, 2006). Microtúbulos são filamentos poliméricos tubulares compostos de repetições de heterodímeros de α/β -tubulina e estão presentes em todas as células eucariotas, realizando o transporte de organelas membranosas e proteínas, por exemplo (LEOPOLD e PFISTER, 2006; NOGALES, 2000). Diferentes funções celulares são afetadas por essas estruturas, de acordo com interações entre os microtúbulos e proteínas específicas, importantes para a regulação e distribuição destes na célula (NOGALES, 2000). Em conjunto, a rede de microtúbulos forma uma estrutura dinâmica e polarizada com dois extremos

distintos: positivos e negativos. Extremos negativos se encontram geralmente nas regiões próximas ao núcleo da célula, enquanto os positivos costumam se estender em direção às periferias (DÖHNER, NAGEL e SODEIK, 2005; SUOMALAINEN, NAKANO, *et al.*, 1999).

Dois complexos proteicos são utilizados com o intuito de ativar esse mecanismo polarizado dos microtúbulos: as cinesinas e as dineínas. As primeiras geralmente realizam o transporte no sentido das terminações positivas, isto é, em direção à periferia das células, enquanto as segundas realizam o movimento em sentido oposto, em direção às regiões mais próximas do núcleo (LEOPOLD e PFISTER, 2006). Apesar da forma como esses mecanismos são ativados pelos vírus ser pouco conhecido, sabe-se que eles se utilizam das dineínas para chegar ao núcleo celular, uma vez que, sem esta ferramenta, se encontrariam no mesmo patamar de dificuldade difusional que uma partícula de DNA plasmidial encontra. No entanto, combinados com a capacidade de transporte das dineínas, que permite um movimento de partículas de diferentes tamanhos a velocidades de até 2 $\mu\text{m/s}$, a partícula viral pode atingir o núcleo em cerca de um minuto após a infecção (LEOPOLD e PFISTER, 2006). Vírus como o Citomegalovírus Humano e o Adenovírus, por exemplo, tem sido estudados no que diz respeito a suas interações com os microtúbulos e como realizam seu tráfego intracelular (OGAWA-GOTO, TANAKA, *et al.*, 2003; SUOMALAINEN, NAKANO, *et al.*, 1999).

As dineínas são, portanto, complexos proteicos que exercem o transporte através dos microtúbulos. Consistem de duas cadeias pesadas (CP, 520 kDa), duas cadeias intermediárias (CI, 74 kDa), um conjunto de cadeias leves intermediárias (CLI, 53 a 57 kDa) e outro conjunto de cadeias leves (CL), formadas pelas famílias LC8, Tctex/Rp3 e LC7/*Roadblock*. As cadeias pesadas são responsáveis pela hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), a ligação com o microtúbulo e o movimento do conjunto. Além disso, ligam-se às cadeias leve, intermediária leve e intermediária. Estas três, por sua vez, regulam a atividade motora e se ligam às cargas de interesse. As diversas combinações entre estas cadeias leves e leves intermediárias permitem o reconhecimento de diversos tipos de carga (DÖHNER, NAGEL e SODEIK, 2005).

Além do aproveitamento do mecanismo por parte dos vírus, qualquer transporte intracelular do DNA após o escape endossomal também é viabilizado através das dineínas e dos microtúbulos. Utilizando-se de microinjeção, em células TC7, de DNA

contendo gene para expressão de GFP, foi possível comprovar que, primeiramente, após cinco horas da injeção, ocorria a expressão da proteína em aproximadamente 40% das células, evidenciando que, numa escala de tempo muito maior, é possível notar algum transporte do DNA ao longo do citoplasma. No entanto, na presença de inibidores de dineínas e de disruptores de microtúbulos, a expressão da proteína foi até quatro vezes menor, demonstrando que há influência destes mecanismos de transporte, ainda que de modo não elucidado (VAUGHAN e DEAN, 2006).

2.3.3. Entrada de transgenes no núcleo

A última etapa na entrega gênica é a passagem do material genético pela membrana nuclear, sendo a principal barreira da entrega gênica (ZANTA, BELGUISE-VALLADIER e BEHR, 1999; AL-DOSARI e GAO, 2009). Existem diversos mecanismos de transporte através do núcleo, variando de acordo com as características das moléculas que devem atravessar a membrana (STEWART, 2007).

Existem ao menos três rotas possíveis de entrada do DNA no núcleo (WIETHOFF e MIDDAGH, 2003), sendo duas delas relacionadas ao tamanho das partículas que tentam atravessar a membrana nuclear. O envelope nuclear é perfurado por complexos de poros nucleares (NPC), formados por grandes estruturas de proteínas. Estes poros, com cerca de 9 nm de diâmetro, permitem a passagem livre de íons e moléculas de tamanho pequeno, como proteínas de até 60 kDa ou DNA de até 300 pb (AL-DOSARI e GAO, 2009; ZANTA, BELGUISE-VALLADIER e BEHR, 1999). Este mecanismo, portanto, é o menos provável e o que apresenta menos estudos experimentais (WIETHOFF e MIDDAGH, 2003). Partículas maiores podem atravessar os poros, no entanto, por transporte ativo podendo ser facilitado pela presença de sequências de localização nuclear (NLS) (BROWN, SCHÄTZLEIN e UCHEGBU, 2001). Diferentes classes de NLS permitem diferentes métodos de entrada no núcleo. O mais comum para importação, por exemplo, envolve o uso de proteínas β -importinas como carreadores, transportando uma grande variedade de cargas e permitindo a importação de proteínas e outras cargas para o núcleo (STEWART, 2007).

O terceiro mecanismo, por fim, envolve a divisão celular. Durante a replicação, grande parte do DNA pode ser incorporada ao núcleo durante o processo de dissolução e reorganização nuclear que ocorre na mitose (AL-DOSARI e GAO, 2009). *In vivo*, no entanto, este mecanismo se torna muito dificultado. Comparativamente, em relação ao tempo de vida do DNA dentro da célula, pode-se considerar que as células neste caso praticamente se encontram num estado de repouso, inviabilizando a entrada por esta rota (ZANTA, BELGUISE-VALLADIER e BEHR, 1999).

2.4. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VETORES NÃO VIRAIS

2.4.1. **Uso de peptídeos e proteínas no desenvolvimento de vetores de entrega gênica**

Considerando as diversas barreiras enfrentadas pelos vetores não virais e que tal dificuldade é o maior impedimento para a obtenção de uma eficiente entrega gênica, conclui-se que é interessante desenvolver vetores que contenham componentes funcionalizados e que formem complexos com o DNA, de modo a conferir variadas características que auxiliem o transporte da informação genética nos diferentes níveis existentes, desde o ambiente extracelular, até sua entrada no núcleo (KIM, PROVODA e LEE, 2015). Idealmente, é interessante conferir ao vetor não viral, mecanismos que se liguem e condensem o DNA. Estas habilidades, em geral, são possíveis a partir do uso de moléculas catiônicas que se ligam ao DNA principalmente por interação eletrostática. Dentre as diversas possibilidades existentes para melhorar a entrega gênica a partir dessas necessidades, estudos vem sendo feitos envolvendo a utilização de peptídeos (principalmente os membrano-ativos) (FERRER-MIRALLES, VÁZQUEZ e VILLAVERDE, 2008) e proteínas, com destaque para aquelas de caráter recombinantes, por permitirem a utilização de vários mecanismos simultaneamente (KIM, PROVODA e LEE, 2015).

Dentre as proteínas estudadas como componentes de entrega gênica, destaca-se a protamina. Trata-se de uma proteína de aproximadamente 5,1 kDa, extraída do espermatozoide de salmão e envolvida nas principais etapas da espermatogênese, se

ligando ao DNA e auxiliando o seu transporte até o núcleo do óvulo após a fertilização (SORGI, BHATTACHARYA e HUANG, 1997). Seu caráter catiônico, devido ao grande número de argininas presente, possibilita essa ligação e condensação do DNA, formando uma partícula toroidal. Através dessa interação, o complexo formado pode apresentar cargas resultantes positivas, o que aumenta a interação destas partículas com a membrana celular, e facilita sua entrada na célula. Além disso, a condensação protege os ácidos nucleicos da degradação por enzimas em ambientes biológicos (KIM, PROVODA e LEE, 2015; KONTANI, AMANO, *et al.*, 1999) e suas sequências ricas em arginina proporcionam eficiente transporte ativo para o interior do núcleo (CHEN, YU, *et al.*, 2011). Estas qualidades, somadas ao fato de que o composto é aprovado pelo FDA, incentivam diversos estudos de entrega gênica, apresentando resultados positivos (CHEN, YU, *et al.*, 2011; SORGI, BHATTACHARYA e HUANG, 1997; PURAS, MARTINEZ-NAVARRETE, *et al.*, 2015).

No desenvolvimento de vetores não virais, diversos componentes funcionais, tais como lipossomos e polímeros, tem sido utilizados para garantir a ligação, condensação e interação celular do DNA, auxiliando-o a superar as barreiras descritas anteriormente. Na maioria dos casos, esta associação com os grupos funcionais se dá a partir de interações físico-químicas. No entanto, uma das estratégias mais recentes para realizar este propósito é o desenvolvimento de proteínas recombinantes. As principais vantagens desta tecnologia em relação aos componentes necessários à conjugação físico-química são a possibilidade de produção em maior quantidade bem como desenvolver proteínas de fusão contendo diversos grupos funcionais simultaneamente, garantindo as características desejadas com maior facilidade (KIM, PROVODA e LEE, 2015). Além disso, considerando as questões de biossegurança envolvidas, as proteínas apresentam características suficientes de biocompatibilidade, por serem os principais componentes estruturais e funcionais de sistemas biológicos (FERRER-MIRALLES, RODRÍGUEZ-CARMONA, *et al.*, 2015).

Mais especificamente, nosso grupo de pesquisa vem realizando avanços no intuito de utilizar as propriedades das cadeias leves de dineína, além de peptídeos membrano-ativos como mecanismos de entrega gênica através do desenvolvimento de novas proteínas recombinantes. Toledo *et al.* (2012) demonstraram a eficiência de um vetor não viral baseado na cadeia leve LC8 combinada com um domínio sintético

de ligação ao DNA (Db), rico em aminoácidos carregados positivamente. Este complexo formado com o plasmídeo, portanto, condensava-o, formando uma partícula de carga positiva, bem como, uma vez dentro da célula (*in vitro*), utilizava o sistema de microtúbulos, interagindo com cadeias intermediárias de dineína, realizando transfecções quase quinhentas vezes mais eficientes que as realizadas utilizando DNA plasmidial nu e trinta vezes mais que utilizando protamina. Apesar dos bons resultados, mostrou-se necessário também que houvessem otimizações de forma a melhorar o escape endossomal, por exemplo.

Posteriormente, um novo estudo foi feito, desta vez utilizando a cadeia leve Rp3, buscando mapear e avaliar as diferentes eficiências possíveis decorrentes dos complexos formados entre as principais cadeias leves e pDNA. Mais uma vez, a proteína foi fusionada ao mesmo domínio de ligação ao DNA e os resultados foram novamente positivos. Os experimentos realizados com esta proteína apresentaram uma eficiência de transfecção cerca de três vezes maior que os resultados obtidos utilizando a proteína contendo LC8 e o Db (TOLEDO, FAVARO, *et al.*, 2013).

Finalmente, o passo seguinte envolveu os resultados positivos obtidos dos estudos feitos com a Rp3, somando-os às vantagens dos peptídeos membrano-ativos. Para tal, adicionou-se à proteína obtida anteriormente à sequência peptídica TAT, conhecida por suas características de penetração celular. Este peptídeo, rico em arginina e lisina, é derivado da proteína trans-ativadora do HIV-1 e é naturalmente capaz de atravessar membranas celulares. Além disso, este peptídeo apresenta também a vantagem de entrar no núcleo celular com uma cinética mais veloz do que a realizada por sinais de localização nuclear. Estas características, portanto, somadas às já estudadas vantagens das cadeias leves Rp3, garantiriam à proteína uma eficiência ainda mais alta realização da entrega gênica. Novamente, os resultados demonstraram que esta nova proteína, chamada T-Rp3 e esquematizada na Figura 4, apresentava uma maior capacidade de condensação do DNA em comparação com complexos formados entre plasmídeo e protamina, apresentando partículas menores, além de serem mais estáveis, uma vez que a carga elétrica resultante da partícula se mostrou positiva e maior, apresentando também menores variações de tamanho ao longo do tempo. Por fim, os estudos de transfecção demonstraram melhor eficiência se comparada com a proteína desenvolvida nos estudos de Toledo *et al.* (2013) (isto

é, sem a sequência TAT), chegando a níveis de expressão 7,5 vezes mais altos (FAVARO, TOLEDO, *et al.*, 2014).

Figura 4 - Esquema ilustrativo da distribuição funcional da proteína T-Rp3 desenvolvida por Favaro *et. al* (2014). A proteína contém uma cauda de histidina (representada em azul), a sequência de ligação com DNA (verde), a cadeia leve de dineínas Rp3 (laranja) e a sequência do peptídeo membrano-ativo TAT (vermelho).

2.4.2. Uso de nanopartículas metálicas no desenvolvimento de vetores de entrega gênica

Além de proteínas e peptídeos, estudos vem sendo realizados utilizando nanopartículas metálicas para finalidades de entrega gênica, incluindo casos de complexos ternários combinando estas com os outros vetores citados. A possibilidade de síntese de partículas pequenas permite uma grande área superficial e, consequentemente, a capacidade de carregar relativamente grandes quantidades de DNA. Mais especificamente, nanopartículas de ouro (NPAu's) aumentam a resistência contra degradação por proteases e nucleases de proteínas e DNA (DELONG, CILLESSEN, *et al.*, 2012). Além disso, nanopartículas deste tipo são naturalmente internalizadas pelas células (SPERLING, GIL, *et al.*, 2008). Essas NPAu's são razoavelmente fáceis de serem sintetizadas em diversos tamanhos de partículas monodispersas a partir de simples modificações em certos parâmetros, além de serem biocompatíveis e não-tóxicas (PARVEEN, MISRA e SAHOO, 2012). Comparadas com polímeros, por exemplo, as nanopartículas de ouro ainda contam com a vantagem de fornecerem um resistente suporte aos materiais terapêuticos a serem entregues, além

de se manterem estáveis mesmo após infinitas diluições, algo impossível para polímeros nanocarreadores (BAHADUR, THAPA e BHATTARAI, 2014).

Diversos métodos de síntese de NPAu's podem ser encontrados na literatura, resultando em nanopartículas de diversos tamanhos e formatos. O método mais recorrentemente utilizado foi desenvolvido por Turkevich *et al.* em 1951. No procedimento, ouro na forma de uma solução aquosa de cloreto de ouro (III) é reduzido por citrato de sódio, resultando em nanopartículas monodispersas de tamanho próximo a 20 nm em uma solução de cor rubi. Os íons citrato, além de serem o agente redutor, garantem também a estabilidade do coloide, uma vez que rodeiam a nanopartícula formada, garantindo uma carga negativa suficiente para repelir outras partículas semelhantes. A reação pode ser dividida em três etapas principais, ocorrendo em paralelo, conforme apresentadas por Kumar *et al.* (2007). A primeira etapa consiste na oxidação do citrato, formando β -cetogluturato, conforme equação 1:

A segunda etapa envolve a redução do sal áurico em sal auroso:

Por fim, o sal auroso se desproporciona em átomos de ouro metálico:

Portanto, a reação de redução geral é:

Diversas modificações foram propostas para este método. Frens (1973), destacadamente, estudou o efeito da quantidade de citrato de sódio, obtendo nanopartículas de 15 a 150 nanômetros de diâmetro. As relações molares utilizadas, no entanto, eram menores que a proposta por Kumar *et al.* (2007) de 1 mol de sal de ouro para 1,5 de citrato. Este estudo indica que há uma etapa intermediária no processo em que β -cetoglutarato, em altas temperaturas, se dissocia em acetona, formando 1 mol de produto para cada 2 de reagente, respectivamente. A acetona, por sua vez, reage com o sal áurico de acordo com a seguinte equação:

Para esta rota de reação, é possível reduzir aproximadamente 3 mols de cloreto de ouro (III) para cada mol de citrato, explicando os resultados obtidos por Frens (1973).

Além disso, essa variação na quantidade utilizada de citrato também afeta as rotas de cristalização das nanopartículas. Existem, dependendo da quantidade de citrato utilizada, duas rotas possíveis de cristalização: a primeira, observada por Turkevich *et al.* (1951), ocorria com uma maior presença do agente estabilizante, ou seja, íons citrato. Neste caso, as partículas são nucleadas mais lentamente e, em seguida, crescem do mesmo modo. Para casos onde há menor quantidade de citrato, estudados por Frens (1973), a nucleação ocorre de maneira mais rápida e, devido à baixa quantidade de íons citrato para estabilizar as partículas, num primeiro momento, nanofios se formam, devido à agregação do ouro. Posteriormente, estes nanofios podem maturar em nanopartículas esféricas conforme íons AuCl_3^- se tornam mais escassos em comparação com a quantidade de íons citrato, possibilitando nessa etapa alguma estabilidade das partículas (JI, SONG, *et al.*, 2007; PONG, ELIM, *et al.*, 2007).

Outro método interessante elaborado a partir dos experimentos propostos por Turkevich *et al.* (1951) consiste na inversão da ordem de adição dos compostos. Originalmente, a solução de citrato de sódio era adicionada à solução de cloreto de ouro (III). Recentemente, no entanto, estudos mostraram que ao inverter a ordem, isto é, adicionando a solução de cloreto de ouro sobre uma solução de citrato de sódio, a formação das NPAu's é acelerada devido a uma maior reatividade do sal áurico e, consequentemente, esferas de ouro de diâmetro até 4 vezes menores se formam (SIVARAMAN, KUMAR e SANTHANAM, 2011).

No entanto, as nanopartículas sintetizadas através do protocolo proposto por Turkevich (e suas conseqüentes modificações, todas utilizando citrato de sódio) não tendem a formar complexos com pDNA, devido à carga negativa de ambos, causando repulsão. Deste modo, é necessário que haja uma funcionalização do ouro, garantindo um caráter positivo e permitindo a formação do complexo com o DNA. Diversas técnicas permitem a mediação da interação entre o ouro e o DNA, através da formação de um complexo intermediário, por exemplo. Estudos realizados utilizando protamina, NPAu e DNA ou RNA comprovaram um efeito mediador por parte da proteína, garantindo, além de suas características como facilitadora de entrega gênica, a possibilidade de interação entre o ouro e os ácidos nucleicos, formando complexos com boa resistência a degradação físico-química, além de manutenção das estruturas e funções das vacinas desenvolvidas (DELONG, AKHTAR, et al., 2009; DELONG, CILLESSEN, et al., 2012).

É importante ressaltar também que as nanopartículas de ouro já foram amplamente utilizadas anteriormente na terapia gênica, principalmente no início dos anos 90 através de um outro método. Neste caso, introduziam-se NPAu's com DNA utilizando forças físicas, com significativa eficiência através da *gene gun*, um dispositivo que disparava o conjunto no tecido sujeito ao tratamento. No entanto, esta técnica se limitava a uma aplicação em órgãos periféricos. Deste modo, trabalhos passaram a ser realizados buscando métodos que permitissem a entrada do conjunto que acionassem mecanismos de internalização celular, como a endocitose, através, principalmente, da adição de estabilizantes (BAHADUR, THAPA e BHATTARAI, 2014).

2.5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE NANOPARTÍCULAS E SUA INFLUÊNCIA NA ENTREGA GÊNICA

2.5.1. Espalhamento dinâmico de luz, diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de entrega gênica, são necessários estudos sistemáticos e comparativos. Para tal, é de extrema importância conhecer e aplicar técnicas de caracterização para uma melhor compreensão da formação e das propriedades do vetor que está sendo utilizado (FERRER-MIRALLES, VÁZQUEZ e VILLAYERDE, 2008). Tratando-se de nanopartículas, o tamanho é a mais importante propriedade física, devendo ser determinada a distribuição de tamanhos presentes na amostra (BRAR e VERMA, 2011).

Dentre as diversas técnicas que fornecem informações sobre o tamanho das partículas analisadas, como microscopia eletrônica de transmissão e de força atômica, o uso do espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) é cada vez mais recorrente nos últimos anos, se tornando um método bem estabelecido, preciso. Esta técnica apresenta vantagens, tais como a rapidez nas medidas, além de representar a totalidade das partículas da população (em oposição a técnicas de microscopia que capturam apenas uma pequena amostra da população). Há também o fato da intensidade do espalhamento de luz ser proporcional à sexta potência do diâmetro da partícula, tornando a técnica extremamente sensível à presença de pequenas partículas agregadas, permitindo um monitoramento da estabilidade coloidal de suspensões de nanopartículas (LIM, YEAP, *et al.*, 2013).

As análises de DLS levam em conta o fato de que as partículas em suspensão estão sujeitas a um constante movimento aleatório, chamado movimento browniano, causado pela interação entre estas e as moléculas de solvente que a circundam. O instrumento de DLS mede a intensidade de espalhamento de luz em função do ângulo de espalhamento e do tempo, dividido em intervalos iguais. Considerando que partículas menores se difundem mais rapidamente que as maiores, é possível relacionar as flutuações da intensidade de luz espalhada que são medidas ao longo

do tempo com a velocidade de difusão e, assim, obter um coeficiente de difusão translacional (D) para o sistema através de análises funções de autocorrelação. Com este coeficiente e através da equação de Stokes-Einstein para movimento browniano, apresentada a seguir, é possível calcular o diâmetro hidrodinâmico médio $d(H)$ das partículas:

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (6)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade. Vale ressaltar, aqui, que $d(H)$ corresponde ao diâmetro de uma partícula aproximado ao de uma esfera e, portanto, um valor bem próximo, mas não exato de seu diâmetro real, caso as partículas estudadas apresentem um formato não esférico (HALLETT, 1994; LIM, YEAP, *et al.*, 2013).

Como foi visto, é de interesse desenvolver vetores de entrega que garantam uma compactação e condensação do pDNA, auxiliando sua passagem pela membrana celular. Estudos prévios realizados utilizando complexos binários entre pDNA e protamina ou T-Rp3 ou terciários formados entre pDNA:protamina/T-Rp3:lipossoma mostraram a possibilidade de formação de partículas pequenas (da ordem de 100 a 150 nm) que apresentaram bons níveis de transfecção, da ordem de 15% para o caso de complexos ternários com protamina e até 25% para casos com T-Rp3 (ALVES, FAVARO, *et al.*, 2017).

2.5.2. Potencial zeta e estabilidade coloidal

O potencial zeta é o principal parâmetro de controle de interações eletrostáticas que ocorrem em uma suspensão de nanopartículas. Devido às cargas superficiais das partículas coloidais, os íons da solução se organizam ao redor destas, formando, deste modo, um gradiente de potencial elétrico ao redor das partículas. Podemos dividir esse gradiente de concentração de contra-íons em duas partes, chamada dupla camada elétrica: a região mais próxima das superfícies dos coloides (camada de

Stern) conta com íons fortemente ligados à superfície, enquanto a camada mais externa (região difusa) contém íons menos associados. O comprimento desta dupla camada é chamado comprimento de Debye. Quando em movimento, a partícula carrega junto consigo uma camada de líquido (e, conseqüentemente, certa quantidade de íons) devido a essa interação eletrostática, formando uma região denominada plano de escorregamento. O potencial elétrico no limite desta camada é chamado de potencial zeta (KASZUBA, CORBETT, *et al.*, 2010). A Figura 5 apresenta um esquema da distribuição de contra-íons na superfície de uma partícula em suspensão.

Figura 5 - Esquema de distribuição de contra-íons sobre a superfície de uma partícula em suspensão coloidal, apresentando as camadas elétricas formadas, bem como o potencial elétrico em função da distância da superfície da partícula. Adaptado de KASZUBA, CORBETT, *et al.*, 2010.

Decorrente do potencial zeta, interações eletrostáticas entre as partículas ocorrem e, conseqüentemente, o estudo deste parâmetro é interessante por permitir a compreensão da estabilidade coloidal, possibilitando a otimização da formação das suspensões, bem como a previsão de sua estabilidade em longo prazo (KASZUBA, CORBETT, *et al.*, 2010). Duas forças principais regem as interações entre partículas numa suspensão coloidal: além das já discutidas, de caráter eletrostático, há também

forças de van der Waals que, para partículas similares, é uma força de atração. Para se obter um coloide estável, é necessário, portanto, que as forças eletrostáticas (repulsivas) superem as forças de van der Waals (atrativas), impedindo que as partículas se agreguem. Para tal, a natureza e a concentração de íons na solução em que se encontram as partículas apresentam papel fundamental. O comprimento de Debye, explicitado acima, varia de maneira inversamente proporcional à concentração destes íons (ou seja, da força iônica). Como se pode esperar, para uma concentração alta de íons, a camada difusa se torna pequena, uma vez que a grande concentração de íons forma um escudo ao redor desta, favorecendo a agregação. Por outro lado, concentrações menores de íons e, portanto, comprimentos de Debye maiores, permitem que as duplas camadas das partículas se sobreponham e, deste modo, haja repulsão eletrostática entre elas, sendo predominante sobre as forças de van der Waals e garantindo estabilidade (EVANS e WENNESTROM, 1999).

Um efeito semelhante ao das forças iônicas sobre o potencial zeta pode ser observado também no que diz respeito à influência do pH sobre as cargas das partículas, que apresentam uma carga que varia de acordo com o pH. Deste modo, abaixo de um determinado pH (que varia de acordo com o tipo de proteína), esta apresenta uma carga líquida positiva e, acima deste, uma carga negativa. O pH em que a partícula apresenta uma carga neutra é chamado ponto isoelétrico (pI). Este comportamento também é observado para macromoléculas, como as proteínas. A protamina, por exemplo, apresenta ponto isoelétrico entre pH 10 e 13, enquanto a T-Rp3 apresenta pI de 9,4 (SILLERO e MALDONADO, 2006; KONTANI, AMANO, *et al.*, 1999).

A partir de fenômenos eletrocinéticos combinados com os princípios de espalhamento dinâmico de luz, é possível medir o potencial zeta das partículas. Aplicando uma determinada voltagem em um par de eletrodos que se encontram em cada extremo de uma célula contendo um coloide, as partículas nele contidas, devido ao seu potencial zeta, se movimentarão de acordo com sua afinidade elétrica. Este movimento pode ser medido pelos mesmos princípios explicados anteriormente de espalhamento dinâmico de luz, permitindo o cálculo do valor do potencial zeta (EVANS e WENNESTROM, 1999; KASZUBA, CORBETT, *et al.*, 2010).

Como foi visto, um estudo sistemático e analítico do potencial zeta de diferentes complexos pode fornecer informações importantes no desenvolvimento de novos

vetores não-virais, otimizando o processo de entrega gênica. Estudos prévios realizados pelo grupo demonstraram que os complexos transfectados com T-Rp3 e protamina, combinados com os lipídios, apresentaram potencial zeta entre +11,9 mV e +36,8 mV (ALVES, FAVARO, *et al.*, 2017). Além disso, pHs e forças iônicas reduzidos apresentaram melhores resultados de transfecção (SILVA, 2015). Como esperado, os resultados comprovam que partículas carregadas positivamente devem gerar melhor interação com a membrana celular, aumentando a eficiência de transfecção.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

- Desenvolvimento de novos vetores não-virais híbridos, baseados em DNA plasmidial, proteínas recombinantes e nanopartículas de ouro, que sejam capazes de atuar como transportadores de DNA para estudos de terapia e vacinação gênicas.

- Estudo do efeito das características físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta) dos complexos ternários formados contendo NPAu's e proteínas sobre a eficiência de transfecção em células de mamíferos, relacionando-as com os mecanismos de entrada e transporte intracelular através do citoplasma.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de nanopartículas de ouro contendo diferentes características físico-químicas através da redução de íons ouro por citrato de sódio através de diferentes métodos. Deste modo, pretende-se avaliar o efeito de tais características na formação dos complexos ternário pDNA-proteína-NPAu, bem como sua influência na eficiência de transfecção destes.

- Transformação, expressão em *E. coli* e purificação do plasmídeo modelo pVAX1Luc, contendo o gene repórter da Luciferase, e da proteína de fusão T-Rp3.

- Estudo de formação dos complexos pDNA-proteína-NPAu utilizando, como proteínas, a protamina e a T-Rp3. Caracterização físico-química dos complexos formados, verificando a influência dos tamanhos das nanopartículas de ouro e das proteínas utilizadas.

- Estudo de transfecção de células de mamífero (HeLa) *in vitro*, buscando-se correlacionar os parâmetros ou características físico-químicas dos complexos formados com a eficiência de transfecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1.1. Método da ordem de adição direta

Para a síntese de nanopartículas de ouro através do método denominado neste trabalho de ordem de adição direta, o protocolo descrito por Turkervich *et al.* (1951) foi seguido, realizando variações nas quantidades de citrato de sódio adicionadas, visando a analisar sua influência nas características das nanopartículas formadas.

De acordo com o protocolo, 95 mL de uma solução de cloreto de ouro (III) trihidratado 0,27 mM, foram mantidos sobre vigorosa agitação magnética enquanto aquecidos até a ebulição (98°C) dentro de um erlenmeyer em banho de óleo de silicone. Ao atingir esta temperatura, 5 mL de uma solução de concentração variada de citrato de sódio tribásico dihidratado (6,8 mM; 13,6 mM; 17,0 mM; 20,4 mM; 34,0 mM e 68,0 mM) foram adicionados imediatamente. A reação ocorreu por 15 minutos, sendo evidenciada pela mudança de coloração de solução, atingindo uma cor vermelho-rubi ao final do processo, como pode ser observada na Figura 6. Após isso, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente. Posteriormente, o volume de solução era completado a 100 ml com água Milli-Q para repor perdas de líquido geradas por evaporação ao longo do experimento. Toda a vidraria utilizada foi previamente lavada e todas as soluções preparadas foram feitas com água de mesmo grau de pureza.

Figura 6 - Coloração da solução ao longo do tempo, evidenciando a formação das nanopartículas de ouro, da esquerda para a direita, aos 1, 7 e 15 minutos após a adição da solução de citrato de sódio.

Amostras de 1 ml eram retiradas e transferidas para cubetas próprias para análise de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta no aparelho de DLS Zetasizer Nano ZS90 da Malvern Instruments (cubetas DTS0012 para a primeira e DTS 1061 para a segunda, ambas comercializadas pela Altmann). Todas as medidas foram feitas em triplicata. Para o caso da análise por microscopia eletrônica de transmissão, 15 μ L da solução final foi gotejado sobre *grid* de 300 *mesh* de cobre com filme de Formvar/Carbono e seco em capela durante a noite. A amostra foi então submetida ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM2100.

4.1.2. Método da ordem de adição inversa

A síntese de NPAu's pelo método da ordem de adição inversa foi realizada de acordo com o proposto por Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011). Adicionalmente a este protocolo, foram realizadas modificações com o objetivo de analisar também o efeito das quantidades de citrato de sódio utilizadas.

Neste método, 95 mL de diferentes soluções de citrato de sódio tribásico dihidratado (0,36 mM; 0,90 mM; 1,79 mM e 3,58 mM) foram aquecidas até a ebulição e mantidas sob vigorosa agitação, da mesma forma que a solução de cloreto de ouro

(III) no método da adição direta. Após atingida a temperatura de ebulição, 5 mL de uma solução de 5,1 mM de cloreto de ouro (III) foram adicionados e a reação ocorreu por 15 minutos. Após isso, a reação foi resfriada à temperatura ambiente, aguardando o equilíbrio e o volume foi completo até 100 mL com água Milli-Q para repor perdas por evaporação. Os cuidados com limpeza de vidraria e preparo de soluções foram os mesmos que aqueles para a síntese de ordem direta.

Do mesmo modo que no método da ordem direta de adição, 1 mL das amostras foram submetidas à medição de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta no mesmo aparelho de DLS. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.1.3. Concentração de NPAu's para uso em complexos pDNA-proteína-NPAu

Para o uso em complexos ternários, as nanopartículas precisaram ser concentradas. Portanto, alíquotas de 1 mL foram transferidas a eppendorfs e submetidas à centrifugação em velocidade de 10.000g por 45 minutos e 4 °C. Após isto, 800 µL do sobrenadante era removido e as NPAu's eram ressuspensas nos 200 µL restantes utilizando um vortexador.

Além disso, foram utilizadas nanopartículas de 5 nm em tampão de citrato, comercializadas pela Sigma Aldrich. Estas, por sua vez, foram concentradas utilizando filtro Amicon Ultra-4 10K, comercializado pela Merck Millipore, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, isto é, centrifugadas a 7.000 g e 10 °C, por um período de tempo entre 3 e 10 minutos, retirando o solvente, sem perda das nanopartículas retidas no dispositivo filtrante até obter a concentração desejada.

Para a confirmação do aumento de concentração de cinco vezes através da centrifugação e para a determinação da nova concentração das nanopartículas após a filtração, foi utilizado a ferramenta de UV-Vis do nanoespectrofotômetro DS-11 da DeNovix e relacionando a absorbância a 450 nm com a concentração de partículas conforme descrito detalhadamente por HAISS, THANH, *et al.*, 2007.

4.2. TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI* E EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para os ensaios de transfecção *in vitro* dos complexos ternários pDNA-proteína-Au, bem como para a caracterização dos vetores não virais formados, foi utilizado o plasmídeo pVAX1Luc. Trata-se de um plasmídeo com 4614 pb, especificamente desenvolvido para emprego em vacinas gênicas e foi construído através da substituição da sequência codificadora da *Green Fluorescent Protein* (GFP) contida no pVAX1GFP, descrito com detalhes em AZZONI, RIBEIRO, *et al.*, 2007. Ao invés do gene referente à GFP, no entanto, há a sequência para expressão de Luciferase, obtida do plasmídeo pGL3-Control (Promega). Resumidamente, o pVAX1Luc contém um promotor do citomegalovírus humano (CMV), gene repórter da Luciferase, gene de resistência à Kanamicina e origem de replicação procariota pMB1. A Figura 7 mostra um esquema do plasmídeo e dos genes nele contidos.

É importante ressaltar que o pVAX1Luc já foi previamente utilizado em outros trabalhos do grupo (TOLEDO, JANISSEN, *et al.*, 2012; TOLEDO, FAVARO, *et al.*, 2013; FAVARO, TOLEDO, *et al.*, 2014) e, portanto, já conta com protocolos e resultados bem estabelecidos, garantindo que seu uso seja adequado para os ensaios realizados neste trabalho.

Figura 7 – Mapa do plasmídeo pVAX1Luc, utilizado como plasmídeo modelo nos ensaios deste trabalho, por conter o gene que codifica para a enzima repórter Luciferase.

Primeiramente, *E. coli* DH5 α quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo. Para tal, 30 ng de DNA foram adicionados a 100 μ L de bactérias e incubados por 1 hora em gelo. Em seguida, foram transferidos para um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e rapidamente recolocados no gelo por mais 2 minutos. Adicionamos, então, 900 μ L de meio SOC e incubamos por 37 °C por 1 hora. Por fim, 100 μ L foram inoculados em placas de LB-ágar contendo Kanamicina a concentração de 30 μ g/ml e incubados *overnight* a 37 °C. Simultaneamente, foi inoculado também um controle em que bactérias que não receberam o plasmídeo foram transferidas para a placa contendo o mesmo antibiótico, permitindo analisar a taxa de mutação espontânea para resistência à Kanamicina das bactérias em questão.

A partir das células transformadas, foi possível realizar o protocolo de expressão e purificação do plasmídeo em quantidade e pureza desejadas para o ensaio. Colônias selecionadas da placa de ágar-LB obtida conforme descrito anteriormente cresceram em tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio Luria-

Bertani (LB) e Kanamicina (30 $\mu\text{g/mL}$) de 6 a 8 horas em *shaker* a 250 rpm e 37 °C. Após este período de crescimento, 60 μL desta cultura foi utilizada como inóculo de 150 mL de meio LB, também contendo Kanamicina, à mesma concentração, em frascos Erlenmeyer. Após o crescimento *overnight*, às mesmas condições descritas previamente, o plasmídeo contido nas *E. coli* foi purificado através do kit Illustra PlasmidPrep Midi Flow da GE Healthcare, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

A pureza do plasmídeo foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% realizada a 60 V e revelada por brometo de etídio e de análise de espectrofotometria no aparelho DS-11 da DeNovix, sendo este aparelho utilizado também para determinação da concentração do pDNA.

4.3. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE T-Rp3

A purificação da proteína recombinante T-Rp3 utilizada para os primeiros ensaios de transfecção foi realizada com o auxílio da aluna de doutorado Marianna Favaro, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, de acordo com o protocolo proposto em sua dissertação de mestrado.

Resumidamente, *E. coli* BL21 (DE3) com gene de resistência à Kanamicina e plasmídeo pET28a que expressa a T-Rp3 foram colocados para crescer *overnight* a 300 rpm e 37 °C em tubos falcon contendo meio LB e Kanamicina (30 $\mu\text{g/mL}$) de forma a se obter um pré-inóculo. Após isso, o inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer contendo o mesmo meio e antibiótico à mesma concentração, onde as bactérias cresceram sob as mesmas condições do pré-inóculo até atingir uma OD_{600} igual a 0,8. Acrescentou-se então IPTG 0,4 mM e, conseqüentemente, houve a indução da expressão da proteína por 4 horas, a 200 rpm e 28 °C. As células foram então recolhidas por centrifugação, ressuspensas em tampão e rompidas por sonicação. Após isso, a proteína T-Rp3 foi purificada por cromatografia em coluna com resina de agarose Ni-NTA por meio de interação com o His-Tag. Realizada a eluição, a proteína foi dialisada em tampão Hepes 40 mM e pH = 7,3.

A análise de pureza da proteína obtida foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida de 13,5%. A concentração da solução proteica obtida foi

determinada através do mesmo espectrofotômetro utilizado para determinação da concentração de plasmídeo, dessa vez utilizando-se um coeficiente de extinção de 1,683.

4.4. FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS pDNA-PROTAMINA/T-Rp3-NPAu

Para a formação dos complexos pDNA-proteína utilizados no ensaio de eletroforese em gel de agarose, 500 ng de pDNA foram adicionados a um volume pré-calculado de tampão Hepes, 40 mM e pH igual a 7,5 de modo a se obter, após a adição das proteínas, volumes de 10 e 20 μ L de complexos com protamina e T-Rp3, respectivamente. A seguir, volumes variados de soluções de protamina (10 mg/ml) e T-Rp3 purificada foram adicionados, de modo a se conjugar diferentes relações mássicas entre DNA e proteínas. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e então transferido para o poço do gel. A eletroforese foi realizada de maneira análoga à descrita para a análise de pureza de pDNA.

Realizou-se a formação dos complexos ternários pDNA-proteína-NPAu de maneira semelhante à descrita anteriormente. 1 μ g de pDNA era adicionado a um determinado volume de tampão. Em seguida, os volumes de soluções de protamina ou T-Rp3 necessários para obter as relações mássicas desejadas eram adicionados e os complexos pDNA-proteína eram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, massas desejadas de NPAu previamente concentradas conforme descrito foram adicionadas e incubadas pelo mesmo tempo e temperatura. Ao final, portanto, os volumes fixos de 50 μ L para complexos utilizando protamina e 100 μ L para aqueles contendo T-Rp3 eram obtidos e utilizados conforme desejado.

Para estudos de caracterização dos complexos ternários, isto é, determinação de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta, ainda, ao final da formação do complexo, adicionou-se 950 ou 900 μ L de água milli-Q, para protamina e T-Rp3, respectivamente. Este 1,0 mL de complexo ternário foi então submetido ao DLS da mesma forma previamente descrita para caracterização de nanopartículas de ouro.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, formando-se sempre três vezes o complexo conforme descrito.

4.5. CULTURA E TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

Para os ensaios de transfecção in vitro foram utilizadas células HeLa cultivadas em frascos T de 25 cm² utilizando meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) complementado com piruvato de sódio (1%), aminoácidos não-essenciais (1%), antimicótico (1%) e gentamicina (0,1%) e 10% de soro fetal bovino (FBS) (v/v). As células foram sempre incubadas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ até a confluência. Uma vez atingido este nível de crescimento, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), tripsinizadas e transfectadas para placas de 24 poços (50.000 células por poço) e novamente incubadas por 40 horas. Após este período (em que se costumava observar confluência próxima de 70%), as células eram transfectadas com 50 ou 100 µL dos complexos ternários pDNA-proteína-NPAu formados da mesma maneira que a descrita na seção anterior. No caso das transfecções utilizando a Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 1,5 µL do lipossoma foi misturado a 48,5 µL de Opti-MEM e incubado por 5 minutos. Simultaneamente, 1 µg de pDNA era adicionado ao mesmo meio, de modo a obter 50 µL de material genético diluído. Ao final do tempo de incubação da Lipofectamina, os dois volumes eram misturados e incubados por 20 minutos adicionais. Em seguida, os 100 µL de complexo eram transferidos para o poço. Após um período de 6 horas, para todos os casos, o meio era substituído por meio fresco. 48 horas após a transfecção, as células eram lavadas com 200 µL de PBS por poço e lisadas e recolhidas de acordo com instruções do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Os lisados celulares eram então submetidos a análise de luminometria no luminômetro de tubos Sirius L (Titertek Berthold), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Cassius Stevani, do Instituto de Química (bloco 8). De modo a garantir uma normalização dos resultados obtidos neste aparelho, foi realizado também ensaio de quantificação de proteínas dos lisados, utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com instruções do fabricante e a leitura das amostras foi realizada no nanoespectrofotômetro DS-11 (DeNovix), em comprimento de onda de 562 nm. Deste

modo, unidades de luz relativas (RLU) obtidas no luminômetro puderam ser normalizadas de acordo com a massa de proteínas contidas no volume de lisado analisado.

Visando a avaliar os diferentes mecanismos envolvidos na entrega gênica, foram realizados também ensaios na presença das drogas nocodazol e cloroquina. Buscando a compreensão da contribuição dos microtúbulos no processo de transporte intracelular, as células foram pré-incubadas por 2 horas na presença de nocodazol (25 μ M), para rompimento dos microtúbulos. Como esta droga estava dissolvida em DMSO, um controle negativo foi utilizado em que as células incubadas eram submetidas ao mesmo volume de DMSO puro (0,4%), pelo mesmo período de tempo. Por fim, visando a estudar o escape e degradação endossomal dos complexos, células foram pré-incubadas por 4 horas na presença de cloroquina (100 μ M). Para os casos de transfecção na presença de drogas, o tempo de incubação das células com os complexos foi de 4 horas. Após isso, o meio era substituído por meio fresco, sem drogas. As demais etapas de coleta de células e análises de luminometria e quantificação total de proteínas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

4.6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E TESTE DE TUKEY

De modo a averiguar a validade dos resultados obtidos, cálculos de ANOVA e teste de Tukey foram realizados, de modo a verificar se há diferença a nível de 5% de significância entre as médias obtidas dos diversos experimentos realizados, sendo o primeiro teste realizado para verificar a diferença entre duas médias e o seguinte para verificar a diferença entre mais de duas médias e, em caso afirmativo, quais são os pares estatisticamente significativos. Todos os cálculos foram realizados através do *software* PASW Statistics 18 (SPSS).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DE NPAu's

5.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio das NPAu's sintetizadas de acordo com o método da ordem de adição direta

Com o objetivo de obter NPAu's contendo diversas características de tamanho e potencial zeta, o método de Turkevich foi modificado no que diz respeito à quantidade adicionada de citrato de sódio. As análises de DLS forneceram o diâmetro hidrodinâmico médio das NPAu's formadas, bem como os valores de polidispersidade de tamanhos, um índice que varia de 0 a 1. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Turkevich et al. (1951), chamado neste caso de "ordem de adição direta", variando-se a razão molar citrato de sódio: cloreto de ouro (III). Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de amostragem.

Razão Molar Citrato:Ouro	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1,3	52,2 ± 2,3	0,701 ± 0,058
2,8	20,8 ± 0,7	0,332 ± 0,068
3,4	21,4 ± 0,2	0,712 ± 0,019
4,0	31,6 ± 1,5	0,524 ± 0,129
6,7	49,6 ± 0,5	0,196 ± 0,001
13,4	57,3 ± 1,6	0,254 ± 0,001

Como se pode notar, as menores partículas são obtidas para valores intermediários da relação molar. Já para os extremos da faixa estudada, as nanopartículas de ouro são maiores. Estes valores estão de acordo com o que foi

observado por Turkevich *et al.* (1951) e com o mecanismo de reação descrito por Kumar *et al.* (2007). Sabe-se que o citrato de sódio, além de redutor dos íons de ouro, atua também como um estabilizante, interagindo eletrostaticamente com a superfície do metal. No caso de menor razão molar (1,3), portanto, pode-se deduzir que uma segunda rota de reação ocorreu, uma vez que, conforme reportado no trabalho, não havia citrato suficiente para reduzir o ouro e, portanto, a acetona foi o agente redutor neste caso. A ausência do citrato causa um aumento nas partículas devido à falta de estabilidade. Utilizando razões molares maiores, o aumento no tamanho médio das nanopartículas também é notado. Desta vez, no entanto, o motivo é o aumento da força iônica causado pelo excesso de citrato de sódio, algo que será explicado em detalhes na análise de potencial zeta.

Deste modo, foi possível obter uma grande variedade de tamanhos de NP_{Au}'s cujo diâmetro hidrodinâmico médio variou de $20,8 \pm 0,7$ nm, quando foi utilizada a razão molar 2,8 na síntese, até $57,3 \pm 1,6$ nm para a razão 13,4.

Além disso, visualmente, foi possível notar também duas rotas de cristalização das nanopartículas, conforme descrito por Ji *et al.* (2007). Para as reações realizadas com razões molares menores que 6,7, nota-se uma mudança intermediária de coloração durante a síntese. Antes de atingir a intensa coloração vermelha no final, a solução coloidal escurece em um tom azul, evidenciando a presença de nanopartículas maiores. De acordo com o estudo citado, nestes casos, nanofios de ouro com diâmetro hidrodinâmico médio maior se formam como uma etapa intermediária de cristalização. Ao decorrer do processo, esses nanofios se rompem e, através da atuação do citrato de sódio, as nanoesferas que obtemos ao final do processo se formam, mantendo-se estáveis devido a este sal. Para os outros dois casos (razões de 6,7 e 13,4), a solução adquire gradualmente uma coloração vermelha sem passar pelo tom azul e, portanto, pode-se concluir que a nucleação e crescimento ocorrem de maneira direta, formando nanoesferas que crescem lentamente. Tal fato também é evidenciado pelas mudanças na polidispersidade das nanopartículas obtidas. Para os casos da rota de cristalização em que há a formação dos nanofios, o PDI tende a valores maiores, se comparados aos dois casos com maior quantidade de citrato de sódio utilizado.

Paralelamente às análises realizadas do diâmetro hidrodinâmico médio, nanopartículas sintetizadas com razões molares de 2,8 e 13,4 foram submetidas à

microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 8 apresenta imagens das nanopartículas de ouro sintetizadas nessas duas condições.

Como se pode notar, a microscopia reforça os resultados obtidos por DLS, apresentando partículas com diâmetro muito próximos daqueles reportados pela técnica de espalhamento de luz. A microscopia apresenta nanopartículas, para o primeiro caso, com tamanho em torno de 15 nm, enquanto aquelas com maior quantidade de citrato possuem diâmetros próximos de 50 nm. Deste modo, pode-se confirmar que os resultados obtidos por ambas as técnicas estão próximos e coerentes.

Figura 8 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com diferentes quantidades de citrato de sódio. À esquerda, NPAu's sintetizadas com 2,8:1 em relação molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III). À direita, utilizando 13,4:1 de relação molar.

5.1.2. Potencial zeta das NPAu's sintetizadas de acordo com a o método da ordem de adição direta

Além de informações essenciais para a compreensão da estabilidade coloidal, as análises de potencial zeta elucidam as rotas de reação e cristalização das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método da adição direta. A Tabela 2

apresenta os resultados obtidos para as mesmas sínteses realizadas na seção anterior.

Tabela 2 - Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Turkevich et al. (1951) (“ordem de adição direta”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III) utilizada. Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.

Razão Molar Citrato:Ouro	Potencial Zeta (mV)
1,3	+43,3 ± 4,1
2,7	-18,9 ± 5,3
3,4	-34,9 ± 11,9
4,0	-52,8 ± 28,4
6,7	-63,1 ± 1,5
13,4	-11,5 ± 9,0

Na maioria dos casos o citrato de sódio garante a estabilidade coloidal, além de garantir às nanopartículas um valor de potencial zeta negativo. Com um aumento da quantidade de citrato de sódio na síntese das nanopartículas, no último caso, nota-se, no entanto, uma diminuição do módulo de potencial zeta. Com a alta quantidade de íons presentes em solução e, conseqüentemente, o aumento da força iônica, a distância de Debye diminui, causando assim uma blindagem nos efeitos eletrostáticos de potencial zeta. Este fenômeno pode ser observado na síntese realizada com razão molar de 13,4 entre citrato de sódio:cloreto de ouro (III) e se reflete também no tamanho das nanopartículas que, conforme visto, apresentam um aumento no valor de diâmetro hidrodinâmico médio. Por outro lado, quantidades baixas de citrato (isto é, abaixo inclusive da estequiometria da rota principal de reação, representada pela síntese de razão 1,3), há uma mudança de comportamento nas camadas eletrostáticas. Neste caso, observa-se que as partículas apresentam um valor positivo de potencial zeta, algo que reforça os indícios de uma segunda rota de reação de síntese, em que a acetona atua como principal redutora do ouro.

A partir destas variações na quantidade de citrato de sódio, foi possível obter nanopartículas de ouro com diferentes potenciais zeta. Valores entre $-63,3 \pm 1,5$ mV

(caso em que se utilizou a razão molar 6,7) e $+43,3 \pm 4,1$ mV (com razão molar de 1,3) foram obtidos. Estas diferentes características serão importantes na formação dos complexos ternários com proteínas e DNA plasmidial, uma vez que se buscam nanopartículas metálicas que interajam, num primeiro momento, com as proteínas, permitindo um tratamento da superfície do ouro, revestindo-a com as macromoléculas e, posteriormente, a formação completa do vetor de entrega com a adição do material genético de interesse.

5.1.3. Diâmetro hidrodinâmico médio das NPAu's sintetizadas de acordo com o método da ordem de adição inversa

Do mesmo modo que as nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich *et al.* (1951), o procedimento proposto por Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011) foi realizado com diversas razões de citrato de sódio:cloreto de ouro. Assim como no caso anterior, os diâmetros hidrodinâmicos médios foram determinados, também utilizando a técnica de DLS. A Tabela 3 apresenta os resultados para as quatro razões molares utilizadas.

Tabela 3 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011) (chamado neste caso de “ordem de adição inversa”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III) utilizada. Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.

Relação Molar Citrato:Ouro	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1,3	$40,8 \pm 1,6$	$0,733 \pm 0,016$
3,4	$23,8 \pm 2,4$	$0,266 \pm 0,007$
6,7	$20,3 \pm 0,7$	$0,294 \pm 0,055$
13,4	$30,1 \pm 4,9$	$0,639 \pm 0,144$

Comparando-se a ordem inversa de adição de reagentes (Tabela 3) com a ordem direta (Tabela 1) para valores iguais de relação molar, podemos notar que,

excetuando-se o caso em que a proporção molar usada foi de 3,4:1, na qual d(H) independe da ordem de adição, a ordem inversa de adição provocou uma redução expressiva destes valores. Notadamente, a reação realizada com razão 6,7 dos reagentes (mais próxima da realizada originalmente no trabalho publicado, ou seja, 5,2) apresentou a diminuição mais significativa, com uma redução de 60% em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas obtidas de acordo com o protocolo de ordem direta de adição, ou seja, $49,6 \pm 0,5$ nm pelo método de Turkevich contra $20,3 \pm 0,7$ nm pelo método da adição inversa.

Estas mudanças nas características das nanopartículas podem ser explicadas pelas diferenças nas concentrações das soluções utilizadas para cada método. Como a solução adicionada de cloreto de ouro (III) no método da adição inversa é muito mais concentrada que a utilizada no método de Turkevich (5,08 mM contra 0,267 mM, respectivamente), a presença de uma maior quantidade do sal áurico em forma reativa na solução de maior concentração aumenta a taxa de oxidação do citrato de sódio. Consequentemente, a redução do cloreto de ouro (III) também ocorre com uma taxa maior e, por isso, temos as diferenças no diâmetro e potencial zeta.

No entanto, observou-se nos experimentos realizados uma discrepância em relação ao trabalho publicado originalmente na situação em que houve um aumento da quantidade de citrato de sódio em relação ao cloreto de ouro (III). De acordo com Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011), com o contínuo aumento da razão molar entre os reagentes (tanto pela adição de uma quantidade maior de citrato de sódio, quanto pela redução da quantidade de cloreto de ouro (III), diminuindo sua concentração na solução), a tendência observada foi de redução do tamanho das nanopartículas de ouro. Nos experimentos realizados, no entanto, o que se observa é um aumento, uma vez que, para uma razão de 6,7, obtiveram-se as menores nanopartículas (discutidas anteriormente) e, com o dobro desta razão (13,4), as NPAu's obtidas apresentaram um valor de $30,1 \pm 4,9$ nm.

5.1.4. Potencial zeta das NPAu's sintetizadas de acordo com o método da ordem de adição inversa

A Tabela 4 apresenta os valores medidos de potencial zeta para quatro condições de quantidade de citrato de sódio adicionada no método de síntese de ordem de adição inversa.

Tabela 4 - Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas de acordo com o método de Sivaraman, Kumar e Santhanam (2011) (chamado neste caso de “ordem de adição inversa”), variando a razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III). Os desvios padrão apresentados são referentes às triplicatas de experimento realizadas.

Razão Molar	Potencial Zeta (mV)
1,3	$-69,0 \pm 8,7$
3,4	$-16,5 \pm 5,2$
6,7	$+6,7 \pm 3,2$
13,4	$+41,9 \pm 13,5$

O que se observa neste caso é uma grande mudança no comportamento do potencial zeta das nanopartículas de ouro, principalmente se comparado com os resultados da síntese em ordem de adição direta. Ao contrário do observado anteriormente, no método da ordem de adição inversa as nanopartículas sintetizadas com uma baixa quantidade de citrato de sódio apresentaram valores negativos e proporcionais, em módulo, à quantidade do reagente em questão. Com o aumento da quantidade deste composto na síntese, ainda, nota-se uma mudança do sinal do potencial, que se torna positivo e crescente para as duas sínteses realizadas com 6,7 e 13,4. Portanto, por este método pôde-se obter nanopartículas com potencial zeta variando desde $-69,0 \pm 8,7$ mV, para o caso com a menor quantidade de citrato de sódio, até $+41,9 \pm 13,5$ mV, para a maior razão molar citrato de sódio:cloreto de ouro (III), de 13,4.

Os valores positivos de potencial zeta mostram que, possivelmente, o íon citrato não age nesses casos como agente estabilizante das nanopartículas. Além

disso, NPAu's com este potencial provavelmente não apresentam interação com as proteínas de interesse para a formação dos complexos ternários, também com potencial zeta positivo, comprometendo seu uso e complexação através de interações eletrostáticas.

5.2. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Após a transformação, expressão em *E. coli* e purificação do DNA plasmidial de acordo com o protocolo descrito, a pureza do material genético obtido foi avaliada qualitativamente por espectrofotometria utilizando-se o espectrofotômetro em função específica para determinação de parâmetros de DNA dupla-fita e também por eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelado por brometo de etídio. Deste modo, obtivemos alta pureza do plasmídeo desejado, evidenciado pelos valores entre 1,93 e 1,97 de relação A_{260nm}/A_{280nm} . Além disso, foi possível determinar que as concentrações obtidas variaram entre 254 e 306 ng/ μ L, sendo estes valores adequados e suficientes para os ensaios seguintes. A Figura 9 apresenta uma análise qualitativa do pDNA purificado realizada através de eletroforese em gel de agarose.

Figura 9 - Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelada por brometo de etídio. (1): marcador de massa molecular de DNA 1 kb (New England Biolabs) (com seus respectivos calores de interesse apresentados à esquerda); (2): pVAX1Luc (4,6 kpb) purificado.

5.3. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE T-Rp3

De maneira análoga aos ensaios realizados para o plasmídeo, a análise de pureza da T-Rp3 expressa e purificada foi realizada. Para tal, utilizou-se novamente o nanoespectrofotômetro, desta vez em função própria para quantificação de proteínas (leitura em comprimento de onda de 280 nm), além de SDS-PAGE de 13,5% e o dobro de SDS para diferentes eluições da coluna de níquel. As análises de espectrofotometria apresentaram valores de A_{280nm} iguais a 2,660. Considerando este valor e o coeficiente de extinção da T-Rp3 (1,643), obteve-se a concentração de 1,47 mg/mL. Esta concentração obtida não era alta o suficiente para a formação de complexos ternários usando as proporções mássicas desejadas e com volume final de 50 μ L (volume utilizado para complexos ternários utilizando a protamina). No entanto, descartou-se a possibilidade de concentrar a proteína usando dispositivos filtrantes (como o Amicon utilizado para concentrar as NPAu's de 5 nm) devido à instabilidade da proteína em concentrações mais altas, algo que causava na maioria

das vezes precipitação. Portanto, a solução adotada foi utilizar um volume final de complexo ternário maior (100 μ L) para a formação dos vetores utilizando a T-Rp3. Posteriormente, será verificado que tal alteração não afetou a capacidade de entrega do plasmídeo de interesse. Por fim, apresenta-se o gel de poliacrilamida na Figura 10, em que se observa que o processo de purificação da proteína foi eficiente, garantindo na eluição final somente a proteína de interesse em solução.

Figura 10 - SDS-PAGE (13,5%) de diferentes eluições da coluna Ni-NTA durante a purificação da T-Rp3 por cromatografia de afinidade. (1): controle positivo de proteína T-Rp3 previamente purificada; (2): extrato proteico obtido após a sonicação da *E. coli*; (3): fração de eluição de extrato proteico; (4) fração de eluição com tampão de extração; (5): fração de eluição com 20 mM de Imidazol em tampão de extração; (6) fração de eluição com 50 mM de Imidazol; (7) fração de eluição com 75 mM de Imidazol; (8): fração de eluição com 500 mM de Imidazol, sendo a banda relativa à T-Rp3 indicada por uma seta.

5.4. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO EM GEL DE AGAROSE DE COMPLEXOS BINÁRIOS pDNA-PROTEÍNA

Visando a comprovar a interação entre as proteínas utilizadas para a formação dos complexos ternários pDNA-proteína-NPAu (protamina e T-Rp3) e o plasmídeo,

ensaios em gel de agarose contendo complexos binários formados por diferentes razões mássicas pDNA:proteína foram realizados.

Para os complexos formados entre pDNA e protamina, foram utilizadas as razões mássicas 1:0,5; 1:5; 1:20 em proporção pDNA:protamina. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos. Como se pode notar, a relação mássica 1:0,5 é uma condição próxima do limite de interação, em que há alguma retenção do DNA no poço. Acima disso, a condensação do plasmídeo pela proteína tende a formar partículas de carga positiva, que ficam retidas no poço do gel ou migram na direção contrária, evidenciando a interação pDNA:proteína.

Figura 11 - Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) revelada por brometo de etídio de complexos binários formados por pVAX1Luc e protamina. Na parte superior da imagem, apresentam-se as razões mássicas pDNA:protamina utilizadas para cada complexo.

De maneira análoga, complexos binários pDNA:T-Rp3 foram formados e analisados utilizando a mesma técnica de eletroforese. Desta vez, no entanto, as

proporções mássicas utilizadas foram 1:1,5; 1:15; 1:30; 1:60, pois a T-Rp3 apresenta um peso molecular maior que a protamina (18,4 kDa e 5,1 kDa, respectivamente). A Figura 12 apresenta os resultados obtidos. Como se pode observar, similarmente, a proporção de 1:1,5 ainda é insuficiente para a complexação de todo o plasmídeo.

Figura 12 – Análise por eletroforese em gel de agarose (0,8%) de complexos vinários formados por pVAX1Luc e T-Rp3. Na parte superior da imagem, apresentam-se as razões mássicas pDNA:T-Rp3 utilizadas para cada complexo.

Partículas positivas formadas a partir da complexação destes dois componentes do vetor são interessantes ao trabalho por, primeiramente, facilitar a interação com a membrana celular (de caráter negativo) durante o processo de entrega e, portanto, sendo desejável um complexo final com esta característica. Além disso, partículas binárias com essa carga teoricamente facilitam a formação posterior dos complexos ternários, considerando o fato de que NPAu's utilizadas terão potencial zeta negativo.

5.5. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO DE COMPLEXOS pDNA:PROTEÍNA:NPAu

5.5.1. Influência do tamanho das NPAu's e das proporções mássicas dos complexos ternários pDNA:protamina:NPAu sobre a eficiência de transfecção

Visando a compreender e buscar melhorias na entrega gênica utilizando nanopartículas de ouro em relação aos complexos binários, foram testadas transfecções utilizando NPAu's de diferentes tamanhos. Além disso, buscando compreender a influência da formação dos complexos sob a eficiência de entrega, foram testadas também diferentes proporções mássicas de seus componentes.

Portanto, foram testados três tamanhos de nanopartículas, de aproximadamente 5, 21 e 57 nm. Estas duas últimas foram sintetizadas de acordo com o método de Turkevich descrito anteriormente, com razões molares de 2,8 e 13,4 de citrato de sódio e cloreto de ouro (III). Elas foram escolhidas para os testes devido ao seu valor de potencial zeta negativo e de módulo próximo (-18,9 e -11,5 mV, respectivamente). As nanopartículas adquiridas da Thermo Fisher também apresentaram valor de potencial zeta próximo das outras duas (-20,0 mV). Além disso, foram utilizadas também quatro proporções mássicas de pDNA:protamina:NPAu, respectivamente: 1:5:4, 1:20:4, 1:40:4 e 1:20:8. Deste modo, foi possível avaliar os efeitos de diferentes quantidades de proteínas e ouro sobre a eficiência de transfecção dos complexos. Como controles negativos, foram analisadas células não transfectadas, células transfectadas com o plasmídeo nú (1:0:0), além de células transfectadas com complexos sem ouro, com proporções análogas (1:5:0; 1:20:0; 1:40:0). Como controle positivo, transfectou-se as células usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher), vetor não viral comercial e mais utilizado atualmente, com elevada capacidade de transfecção *in vitro*. No entanto, o maior problema da Lipofectamina é sua elevada citotoxicidade. A Figura 13 apresenta os resultados de transfecção obtidos.

Figura 13 - Eficiência de transfecção de células HeLa utilizando vetores não virais formados por **pDNA-Protamina-NPAu**, variando as proporções mássicas dos complexos ternários (indicadas abaixo eixo x) e o diâmetro das nanopartículas de ouro (indicados abaixo das proporções). Controles sem transfecção, transfectados com pDNA nu, Lipofectamina e complexos binários pDNA-Protamina também são apresentados. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas realizadas.

Primeiramente, observa-se a melhoria proporcionada pelo uso da protamina e das nanopartículas de ouro sobre a eficiência de transfecção nas células HeLa. Visivelmente superiores, todos os complexos formados, com ou sem nanopartículas de ouro, apresentaram transfecção maior que o controle negativo utilizando somente pDNA nú. Além disso, o uso das nanopartículas de ouro também demonstrou uma melhora no processo de entrega gênica, gerando melhores resultados se comparados complexos que não continham NPAu's, principalmente para os vetores que continham quantidades maiores de protamina, em que as diferenças de transfecção foram mais claras. Complexos do tipo 1:5:4, por exemplo, apresentaram resultados de transfecção mais semelhantes entre si, se comparados aos outros.

Como se pode observar, de maneira geral (é importante ressaltar que a maior eficiência de todas não se deu com esta NPAu), complexos formados utilizando nanopartículas maiores, de 57 nm, apresentaram maiores eficiências de transfecção se comparados aos complexos formados com as nanopartículas menores. Estes complexos, também, não apresentaram resultados tão diferentes entre si no que diz respeito às proporções mássicas, garantindo uma transfecção da ordem de $5,00\text{E}+05$ RLU/mg, aproximadamente.

Analisando especificamente as proporções mássicas utilizadas, é notável o fato de que complexos formados na proporção 1:40:4 apresentaram as melhores eficiências de transfecção para todos os casos. Foi sob esta condição, inclusive, que se obteve o melhor resultado de transfecção com este tipo de proteína, através do complexo formado com as nanopartículas de 5 nm, obtendo um valor de $3,37\text{E}+06$ RLU/mg de atividade de luciferase (este é o único valor estatisticamente significativo em relação a todos os pares formados do complexo formado com esta proteína). Além disso, geralmente, aumentos nas quantidades de protamina causaram um aumento na eficiência de entrega, enquanto um aumento nas quantidades de nanopartículas de ouro causaram uma queda neste parâmetro.

Por fim, ainda é importante ressaltar que estes resultados estão muito distantes da alta eficiência de transfecção obtida pela Lipofectamina, controle positivo. O melhor resultado de transfecção utilizando ouro e protamina (1:40:4 com nanopartículas metálicas de 5 nm) apresenta uma atividade de luciferase 206 vezes menor que o vetor não viral comercial ($6,97\text{E}+08$ RLU/mg contra $3,37\text{E}+06$ RLU/mg). No entanto, as diferenças proporcionadas pelo uso de NPAu's são importantes e serão

investigadas posteriormente através da caracterização destes complexos em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta.

5.5.2. Influência do tamanho das NPAu's e das proporções mássicas dos complexos ternários pDNA:T-Rp3:NPAu sobre a eficiência de transfecção

Analogamente aos ensaios realizados utilizando complexos com protamina, um estudo de vetores não virais formados com T-Rp3 também foi realizado. Novamente, nanopartículas de 5, 21 e 57 nm foram utilizadas. Desta vez, no entanto, as proporções dos complexos ternários testadas foram 1:15:4, 1:60:4, 1:80:4 e 1:60:8, mantendo, assim, como citado anteriormente, uma semelhança em quantidades molares entre os complexos formados entre as duas proteínas. Devemos ressaltar, também, que as duas últimas condições citadas se mostraram limítrofes, não permitindo uso de maiores quantidades de ouro ou proteína, visto que, nesses casos, a presença de uma baixa quantidade de precipitados ocorria, algo que poderia se agravar e causar prejuízos ao metabolismo celular caso as massas utilizadas de algum dos compostos fosse maior.

Novamente, os ensaios foram realizados tomando como base comparativa diferentes controles. Além das já citadas células sem transfecção, pDNA nú (1:0:0) (controles negativos) e Lipofectamine 2000 (controle positivo), desta vez, foram utilizadas, substituindo os complexos binários de pDNA:protamina, vetores formados por pDNA:T-Rp3 nas proporções 1:15, 1:60 e 1:80. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos. Devido ao elevado número de comparações realizadas, a análise de variância entre os pares de complexos utilizando esta proteína se encontra em tabela anexa a esta dissertação.

Figura 14 - Eficiência de transfecção de células HeLa utilizando vetores não virais formados por **pDNA-T-Rp3-NPAu**, variando as proporções mássicas dos complexos ternários (indicadas abaixo do eixo x) e o diâmetro das nanopartículas de ouro (indicados abaixo das proporções). Controles sem transfecção, transfectados com pDNA nu, Lipofectamina e complexos binários pDNA-T-Rp3 também são apresentados. As barras de erro representam o desvio padrão das triplicatas realizadas.

Novamente é notável a melhora na eficiência de transfecção para todos os casos contendo T-Rp3, sendo complexos binários ou ternários, em relação àqueles que contém protamina, aumentando as atividades de luciferase da ordem de $1,00\text{E}+04$ RLU/mg e $1,00\text{E}+05$ RLU/mg para os vetores não virais da protamina para a ordem de $1,00\text{E}+06$ RLU/mg e $1,00\text{E}+07$ RLU/mg, em média, nos complexos contendo T-Rp3, evidenciando que as diversas ferramentas combinadas nesta proteína (peptídeo membrano-ativo, ativação de microtúbulos, etc.) geram uma melhora no processo de entrega gênica.

De maneira geral, pode-se notar também que o uso das nanopartículas de ouro novamente proporcionou melhorias na eficiência de transfecção em relação aos complexos binários contendo apenas proteína. No entanto, também é notável que essa melhora foi mais sutil se comparada com as diferenças nos complexos utilizando protamina. Como nos complexos com protamina, os casos com a menor quantidade proteína (1:15, neste caso) foram os que menos mostraram diferenças de atividade de Luciferase a partir da mudança dos diâmetros das nanopartículas metálicas.

Novamente, complexos ternários utilizando nanopartículas de 57 nm apresentaram melhor eficiência de transfecção. É possível que NPAu's deste tamanho modifiquem a formação do complexo, uma vez que, em menor quantidade e por serem maiores, funcionem como a base do vetor, sendo circundado por complexos binários pDNA:proteína e, deste modo, a entrega ocorra de maneira diferenciada. Entre as diferentes proporções mássicas dos complexos com essas NPAu's, também não houve diferenças notáveis de eficiência de transfecção. Vale destacar que é neste conjunto de complexos que se encontram duas das maiores atividades de Luciferase, nas proporções 1:60:4 e 1:60:8, com $7,44\text{E}+07$ RLU/mg e $7,36\text{E}+07$ RLU/mg, respectivamente, o que representa uma eficiência de transfecção apenas cerca de 9 vezes menor que a Lipofectamina, controle positivo.

Sobre as proporções mássicas, para os complexos utilizando T-Rp3, os aumentos da quantidade de proteína de 60 µg para 80 µg por µg de pDNA e o aumento de 4 para 8 µg de NPAu para cada µg de material genético não causaram diferenças tão significativas nas eficiências de transfecção se comparadas às diferenças nos complexos com protamina. Para as quantidades de proteína, tal resultado pode ser esperado, considerando que o aumento na quantidade de protamina é

proporcionalmente maior do que o de T-Rp3 (dobrou-se a massa de protamina, enquanto adicionou-se apenas 33% a mais de T-Rp3). No caso do aumento da quantidade de ouro, em geral, pode-se notar uma diminuição na atividade de Luciferase, assim como para a protamina, porém de uma maneira bem menos acentuada.

Em comparação com trabalhos prévios, é importante ressaltar as diferenças obtidas nos resultados brutos entre este trabalho e o trabalho anterior desenvolvido por Favaro *et al.*, 2014. Os valores de atividade de Luciferase, como se poderá notar nesta e na seção anterior deste trabalho, são da ordem de $1,00\text{E}+02$ RLU/mg menores ($5,19\text{E}+10$ RLU/mg) que as dos mesmos complexos binários testados no trabalho citado, além dos controles. Isso se deve às diferenças nos luminômetros utilizados, que fornecem unidades relativas de luz (RLU) diferentes entre si. Deve-se, portanto, fazer uma comparação semi-quantitativa ao se comparar os trabalhos, analisando as diferenças proporcionalizadas entre os complexos.

5.5.3. Avaliação do escape endossomal e do transporte por microtúbulos em transfecções utilizando complexos ternários pDNA:T-Rp3:NPAu

Além de analisar as eficiências de transfecção dos complexos ternários propostos neste trabalho, buscando aqueles que apresentem melhores resultados, é interessante, também, compreender quais mecanismos estão envolvidos no processo de entrega gênica destes vetores. Deste modo, buscamos ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos de entrega resultantes do uso das nanopartículas de ouro em relação aos complexos binários contendo pDNA e proteína.

Foram realizados, portanto, ensaios utilizando a droga cloroquina, visando a avaliar o escape endossomal e a droga nocodazol, visando a avaliar a importância da rede de microtúbulos para o transporte intracelular do complexo ternário. Nestes ensaios, foram testados, para efeito de comparação, complexos binários pDNA:T-Rp3 na proporção mássica 1:60 e os vetores de interesse, complexos ternários pDNA:T-Rp3:NPAu de proporção 1:60:4 e formados com nanopartículas de 5 e 57 nm. Estes dois complexos foram escolhidos pois, além de permitir uma comparação com o

complexo sem ouro, permitiriam também verificar os efeitos dos tamanhos das nanopartículas sobre os mecanismos de entrega gênica. Deste modo, as maiores e menores nanopartículas de ouro foram escolhidas.

Para que fosse possível avaliar os efeitos das drogas e, consequentemente, os mecanismos envolvidos na entrega gênica, transfecções na ausência de cloroquina e nocodazol foram realizadas simultaneamente e seus resultados foram normalizados para 100%, lembrando que o nocodazol estava dissolvido em DMSO e, portanto, seu controle é diferente daquele realizado com cloroquina. A partir desses resultados, novas porcentagens relativas aos ensaios com as drogas eram calculados. Primeiramente, serão analisados os resultados obtidos para os estudos de escape endossomal, através do uso da cloroquina. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos.

Figura 15 - Ensaio de transfecção de complexos binários (pDNA:T-Rp3) ou ternários (pDNA:T-Rp3:NPAu) utilizando a droga cloroquina, com o objetivo de analisar o envolvimento dos endossomas na eficiência de entrega gênica. As proporções mássicas pDNA:T-Rp3:NPAu, bem como o tamanho das nanopartículas utilizadas estão indicadas abaixo das legendas de controle ou presença da droga. As barras de erro representam o desvio padrão do experimento realizado em triplicata. O sinal * indica que os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Primeiramente, pode-se confirmar que, apesar dos altos desvios padrão obtido em alguns casos, para os complexos binários utilizando pDNA e T-Rp3, o escape endossomal é um fator limitante e dificulta melhores resultados no processo de entrega gênica utilizando este vetor. Com o auxílio da cloroquina, por sua vez, a eficiência de transfecção cresceu aproximadamente três vezes, estando os resultados obtidos de acordo com o que foi reportado por Favaro *et al.*, 2014. Deste modo, a cloroquina, utilizando sua função de se acumular nas vesículas endossomais e impedir a acidificação das mesmas, leva a uma expansão do volume e aumento da fragilidade da membrana, auxiliando assim o escape endossomal. Por outro lado, o que se observa com a formação dos complexos ternários contendo as nanopartículas de ouro é uma redução significativa da eficiência de transfecção utilizando a cloroquina, reduzindo para dois terços da capacidade de transfecção dos complexos utilizando nanopartículas maiores (57 nm) e até 25 vezes a eficiência de transfecção com as menores nanopartículas (5 nm). Tal fato pode indicar que as nanopartículas de ouro apresentam uma boa capacidade de escape endossomal e que, com a adição de cloroquina, a citotoxicidade da droga (a cloroquina também afeta o processo de autofagia, impedindo a degradação e reciclagem de componentes celulares) se torna um fator de maior relevância e reduz a eficiência de transfecção se em comparação ao controle.

Além dos ensaios com cloroquina, as transfecções realizadas na ausência e presença da droga nocodazol nos forneceram outras informações importantes sobre o mecanismo de entrega gênica dos vetores estudados. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos. A partir destes, pode-se observar uma dependência maior dos microtúbulos por parte dos complexos binários e dos complexos ternários com nanopartículas de 5 nm. Para os primeiros complexos citados, com a consequente disrupção dos microtúbulos através do nocodazol, houve uma redução de 27% na eficiência de transfecção. Os complexos contendo nanopartículas metálicas de 5 nm, no entanto, apresentaram uma dependência maior dos microtúbulos, com uma redução de 74% da capacidade de entrega gênica. Considerando-se que, de modo geral, estes complexos apresentaram uma eficiência de transfecção um pouco maior que a do complexo binário de mesma proporção mássica (ver seção 5.5.2), é possível que a presença das nanopartículas metálicas auxiliem a entrega, em uma formação dos compostos em que a T-Rp3 se encontre mais exposta e capaz de se ligar aos

motores moleculares presentes nos microtúbulos de forma mais eficiente. Esse resultado é também coerente com aquele apresentado na Figura 15, uma vez que estes complexos ternários dependem menos do transporte intracelular efetuado no interior de vesículas, sendo, portanto, mais dependentes do transporte ativo por motores moleculares ao longo dos microtúbulos. Por outro lado, complexos ternários contendo nanopartículas de ouro de 57 nm demonstraram uma maior facilidade de transfecção após o rompimento dos microtúbulos, demonstrando menor dependência da interação com essa rede de transporte intracelular. Este possível aumento observado pode indicar que os microtúbulos agem, para este caso, como uma barreira física aos complexos e que, quando rompidos, o vetor não viral encontra uma barreira a menos para realizar a sua função de entrega.

Figura 16 - Ensaio de transfecção de complexos binários (pDNA:T-Rp3) ou ternários (pDNA:T-Rp3:NP Au) utilizando a droga nocodazol, com o objetivo de analisar o envolvimento dos microtúbulos na eficiência de entrega gênica. As proporções mássicas pDNA:T-Rp3:NP Au, bem como o tamanho das nanopartículas utilizadas estão indicadas abaixo das legendas de controle ou presença da droga. As barras de erro representam o desvio padrão do experimento realizado em triplicata. O sinal * indica que os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Em relação aos desvios padrão elevados obtidos tanto no caso utilizando a cloroquina, quanto no caso utilizando o nocodazol, deve-se atentar ao fato de que as ordens de grandeza considerada são muito diferentes entre si. Deste modo, ao normalizar os resultados, muitas vezes essas diferenças de ordem de grandeza causa uma sensibilidade elevada nos cálculos de desvio padrão, tornando-os tão expressivos. Visando a principalmente contornar este problema, além dos gráficos apresentados, ao final deste trabalho, em anexo (Tabela 10), podem ser encontrados os valores brutos de transfecção, numa tentativa de oferecer uma alternativa de análise de resultados.

5.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS TERNÁRIOS pDNA-PROTEÍNA-NPAu

5.6.1. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Potencial Zeta de complexos ternários pDNA:Protamina:NPAu

Dentre os complexos ternários utilizados nos estudos de transfecção, alguns foram selecionados para a caracterização por espalhamento dinâmico de luz, visando a relacionar o diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta com as suas respectivas eficiências de transfecção, além de verificar a influência do tamanho das nanopartículas de ouro utilizadas nas características finais do vetor não viral formado. Para a protamina, portanto, foram selecionados os complexos de proporção mássica 1:40:0 e 1:40:4 e, dentre os complexos contendo ouro, novamente foram utilizadas as nanopartículas de 5, 21 e 57 nm. A Tabela 5 apresenta os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio, bem como os de polidispersidade obtidos.

Tabela 5 - Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade de complexos ternários pDNA-protamina-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.

Relação Mássica	Diâmetro da NPAu (nm)	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:40:0	-	207 ± 14	0,202 ± 0,019
1:40:4	5	137 ± 39	0,970 ± 0,027
1:40:4	21	116 ± 41	0,935 ± 0,113
1:40:4	57	363 ± 20	0,940 ± 0,054

Como se pode observar, nanopartículas menores de ouro (5 e 21 nm) causaram uma diminuição no tamanho final do complexo, podendo reduzi-lo a quase metade de seu tamanho (de 207 nm, sem NPAu, para 116 nm com nanopartículas metálicas de 21 nm). Deve-se ressaltar, também, que estes resultados são estatisticamente significativos ao nível de 5%. Além disso, as nanopartículas metálicas maiores causaram um aumento no tamanho dos complexos, sendo estes complexos os maiores obtidos. Tal mudança no diâmetro dos vetores pode indicar uma mudança na formação dos complexos, indicando que, neste caso, a nanopartícula de ouro poderia servir como uma base para a adsorção dos complexos binários sobre ela. Tal ideia é reforçada principalmente pelas razões molares uma vez que, nessas relações mássicas, as mudanças no diâmetro das NPAu's geram uma mudança nas quantidades relativas de partículas de ouro para cada partícula de DNA. Há, portanto, 1:12, 5:1 e 117:1 em relação molar pDNA:NPAu para os diâmetros 5, 21 e 57 nm, respectivamente.

Apesar das variações obtidas nos diâmetros, estes dados não são únicos para explicar as melhorias observadas nas transfecções utilizando os complexos com NPAu's. Como se pode observar, complexos de tamanho intermediário, com 137 nm (utilizando as menores nanopartículas de ouro, de 5 nm) apresentaram os melhores valores de transfecção (3,37E+06 RLU/mg), tendo em segundo lugar os maiores complexos, com 363 nm (utilizando nanopartículas de 57 nm e com eficiência de transfecção 7,78E+05 RLU/mg), contrariando a expectativa de que complexos menores teriam maior sucesso em entregar o material genético. Além disso, é importante também destacar os elevados valores de polidispersidade destes

complexos, atingindo valores muito próximos do limite superior permitido, indicando uma grande variação ao redor da média de diâmetro obtida.

Portanto, faz-se necessário observar também os valores de potencial zeta, obtidos, apresentados na Tabela 6, e tentar relacioná-los com as eficiências de transfecção, buscando uma relação melhor estabelecida.

Tabela 6 – Potencial Zeta de complexos ternários pDNA-protamina-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.

Relação Mássica	Diâmetro da NPAu (nm)	Potencial Zeta (mV)
1:40:0	-	+20,4 ± 3,1
1:40:4	5	+7,3 ± 0,3
1:40:4	21	+22,5 ± 1,0
1:40:4	57	+9,6 ± 0,3

Primeiramente, o que se pode observar é a diminuição do potencial zeta em dois dos três casos de complexos contendo NPAu's em relação ao complexo binário. As menores e maiores nanopartículas de ouro reduziram para cerca de um terço e metade, respectivamente, o valor de potencial zeta. No entanto, nanopartículas de 21 nm apresentaram valores mais próximos dos complexos binários. Deste modo, foi possível observar complexos cujos potenciais zetas variaram de +7,3 até +22,5 mV. Quanto às análises estatísticas, podemos dizer que a maioria dos casos são estatisticamente significativos ao nível de 5%, excetuando-se dois pares: formados por complexos sem nanopartículas e formados por nanopartículas de 21 nm (46,2% de significância) e o par de complexos formados por nanopartículas de 5 e 57 nm (39,8% de significância).

Relacionar estas características nos permitem, no entanto, extrair algumas informações mais relevantes sobre as eficiências de transfecção. Como era esperado, complexos tanto binários, quanto ternários de caráter positivo apresentaram a capacidade de entregar o material genético ao núcleo da célula. No entanto, o que se observa é que complexos cujos potenciais zetas são de menor módulo (com NPAu's

de 5 e 57 nm) apresentaram maior capacidade de transfecção. Estes valores são interessantes à medida que mostram que o fato de um complexo ser cada vez mais positivo não gera necessariamente uma maior eficiência de entrega gênica.

5.6.2. Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Potencial Zeta de complexos ternários pDNA:T-Rp3:NPAu

Além dos complexos utilizando protamina, apresentados na seção anterior, de maneira análoga, foram caracterizados também complexos binários e ternários utilizando a T-Rp3. Desta vez, complexos com proporção mássica 1:60:0 e 1:60:4, estes com as mesmas nanopartículas utilizadas anteriormente (5, 21 e 57 nm) foram caracterizados. A Tabela 7 apresenta os valores referentes à diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade obtidos.

Tabela 7 - Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Polidispersidade de complexos ternários pDNA-T-Rp3-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.

Relação Mássica	Diâmetro da NPAu (nm)	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade (PDI)
1:60:0	-	143 ± 6	0,240 ± 0,55
1:60:4	5	135 ± 14	0,721 ± 0,73
1:60:4	21	307 ± 14	0,268 ± 0,17
1:60:4	57	240 ± 23	0,447 ± 0,95

Podemos observar, nesses casos, novamente, a tendência de NPAu's menores garantirem complexos ternários de tamanho final também menores, se comparados com aqueles formados com nanopartículas de ouro de 21 nm e 57 nm. No entanto, não é possível afirmar com certeza se esses complexos são de fato menores que os complexos binários, sem ouro, por não serem estatisticamente significativos ao nível de 5% (todos os outros pares possíveis apresentaram significância estatística satisfatória). Além disso, excetuando-se o complexo com nanopartículas de 21 nm,

todos os diâmetros médios destes vetores foram menores se comparados aos complexos formados com protamina e suas respectivas nanopartículas. A diferença de comportamento na formação dos complexos, no entanto, se deu majoritariamente se compararmos os dois complexos com as maiores NPAu's. Enquanto com a protamina o menor complexo foi o formado com as nanopartículas de 21 nm (116 nm), no caso da T-Rp3 foi justamente o contrário, com os maiores complexos ternários formados utilizando essa mesma nanopartícula (307 nm). Deste modo, através de simples variações na presença e no tamanho da nanopartícula, foi possível variar o tamanho total do complexo de 135 a 307 nm.

Desta vez, podemos também extrair mais alguma relação entre o tamanho dos complexos e sua eficiência de transfecção. Complexos maiores (307 e 240 nm), inesperadamente, apresentaram maior eficiência de transfecção. No entanto, o maior valor de diâmetro de complexo não gerou necessariamente a melhor transfecção, uma vez que os complexos utilizando nanopartículas metálicas de 57 nm apresentaram os melhores resultados. Além disso, em relação aos resultados obtidos nos ensaios utilizando nocodazol, reforça-se o fato de que os microtúbulos podem servir de barreira difusional de transporte do DNA, uma vez que há uma diferença significativa tanto no tamanho dos complexos, quanto na eficiência de transfecção, isto é, com o rompimento dos microtúbulos, os vetores não virais maiores apresentaram uma maior facilidade de entrega gênica.

Além dos resultados de diâmetro hidrodinâmico médio, também é importante observar os resultados de potencial zeta, bem como compará-los com as eficiências de transfecção obtidas e com seus complexos semelhantes utilizando protamina. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 8 - Potencial Zeta de complexos ternários pDNA-T-Rp3-NPAu formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de nanopartículas de ouro. Os desvios padrão apresentados são baseados nos dados obtidos nas triplicatas dos experimentos realizados.

Relação Mássica	Diâmetro da NPAu (nm)	Potencial Zeta (mV)
1:60:0	-	+18,9 ± 2,6
1:60:4	5	+10,6 ± 0,4
1:60:4	21	+27,2 ± 1,2
1:60:4	57	+16,9 ± 0,4

Novamente, o que se pode notar é a tendência de nanopartículas menores e maiores gerarem um potencial zeta inferior ao complexo análogo sem ouro, enquanto o complexo formado com as nanopartículas de ouro de 21 nm gerou uma carga resultante superior. Desta vez, no entanto, ao comparar com os resultados obtidos com a protamina, podemos notar que complexos utilizando a T-Rp3 e ouro são mais positivos do que complexos ternários pDNA-protamina-NPAu, mesmo considerando a proporção molar maior para a protamina (isto é, em massa, as quantidades são 40 e 60, respectivamente para protamina e T-Rp3, porém, em mol, tal diferença se inverte para 16.000 e 8.000).

Em relação às eficiências de transfecção, novamente nota-se que não é necessariamente o complexo ternário mais positivo o responsável por obter a melhor eficiência de entrega. Neste caso, o vetor viral com potencial zeta de +16,9 mV apresentou anteriormente a melhor eficiência de transporte de DNA. De qualquer modo, todos os complexos obtidos tiveram caráter positivo, reforçando sua importância em realizar uma entrega eficiente. Desta vez, obteve-se complexos cujo potencial zeta variou de +10,6 a +27,2 mV. Com a exceção do par formado pelos complexos sem ouro e com nanopartículas de 57 nm, todos os outros apresentaram significância estatística abaixo de 5%.

6. CONCLUSÕES

- A partir de variações nas relações molares entre citrato de sódio e cloreto de ouro, bem como na ordem de adição destes compostos na reação, foi possível obter nanopartículas de ouro com diferentes diâmetros médios (entre 20,3 e 57,3 nm), polidispersidade e potenciais zeta (entre -69,0 e +43,3 mV);

- Em combinação com pDNA e as proteínas protamina ou T-Rp3, as nanopartículas metálicas citadas no tópico anterior se complexaram eletrostaticamente em um vetor não viral capaz de entregar material genético ao núcleo das células de interesse;

- As nanopartículas metálicas se mostraram adjuvantes importantes no processo de entrega gênica, garantindo diferentes capacidades de entrega do pDNA (entre 4,61E+04 e 7,44E+07 RLU/mg) a partir de variações tanto em seu diâmetro quanto nas relações mássicas pDNA-proteína-NPAu utilizadas;

- Vetores formados pela T-Rp3 combinada com as NPAu's apresentaram, de maneira geral, eficiências de transfecção superiores aos complexos utilizando a protamina como proteína principal, conforme esperado, indicando que as propriedades presentes na proteína recombinante auxiliam na entrega;

- Ensaios utilizando cloroquina indicaram que as nanopartículas de ouro exercem um importante papel no escape endossomal destes vetores não virais durante o processo de entrega;

- Ensaios utilizando nocodazol indicaram que o papel dos microtúbulos é importante para o transporte gênico em complexos que continham a T-Rp3, no entanto, com o aumento do diâmetro hidrodinâmico dos vetores não virais, esta ferramenta pode se tornar uma barreira de entrega.

- A presença de nanopartículas de ouro combinadas com protamina gerou complexos ternários, de maneira geral, de tamanho menor (entre 116 e 363 nm) se comparados aos complexos binários com a mesma proteína (207 nm). Além disso, complexos utilizando a T-Rp3 apresentaram, em geral, diâmetros menores (entre 135 e 307 nm) se comparados com os complexos com a protamina. Isto evidencia a maior facilidade de vetores menores realizarem a entrega gênica mais eficientemente. Deve-

se ressaltar que, entre complexos utilizando a mesma proteína, não foi necessariamente o menor complexo que gerou a melhor eficiência de transfecção;

- Os complexos binários e ternários formados apresentaram, em todos os casos, um potencial zeta de valor positivo. De maneira geral, os valores para complexos com a T-Rp3 (entre +10,6 e +27,2 mV) são maiores se comparados com os valores obtidos para os vetores utilizando a protamina (entre +7,3 e +22,5 mV). No entanto, um módulo maior não ocasionou necessariamente uma melhor eficiência de transfecção entre os complexos de mesma proteína;

- Deste modo, podemos concluir que os vetores não virais formados com ouro apresentaram melhores eficiências de transfecção, no entanto, mais estudos são necessários antes de uma aplicação *in vivo*;

- Como principais propostas de trabalhos futuros, sugere-se principalmente um estudo sobre a citotoxicidade destes novos vetores não virais formados, bem como um aprofundamento nos mecanismos envolvidos na entrega gênica dos mesmos, principalmente na etapa de endocitose e escape endossomal, além de buscar novas modificações que possibilitem uma aproximação ainda maior do nível de eficiência de entrega do vetor não viral comercial disponível;

- Alternativamente ao ouro, sugere-se também estudos futuros utilizando outras nanopartículas metálicas, tais como prata e platina, buscando descobrir possíveis novos mecanismos de entrega gênica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DOSARI, M. S.; GAO, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 4, p. 671-681, 2009.

ALVES, R. F. **Desenvolvimento e caracterização de vetores não virais para entrega gênica baseados em proteínas e lipossomas**. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 92. 2014.

ALVES, R. F. et al. Recombinant protein-based nanocarriers and their association with cationic liposomes: characterization and in vitro evaluation. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 513, p. 1-10, 2017.

AZZONI, A. R. et al. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, p. 392-402, 2007.

BAHADUR, R. K. C.; THAPA, B.; BHATTARAI, N. Gold nanoparticle-based gene delivery: promises and challenges. **Nanotechnology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 269-280, 2014.

BERMAN, P. J. et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4582-4585, 2006.

BLEASE, R. M. et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years. **Science**, v. 270, p. 475-480, 1995.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.

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

CAPEK, I. **DNA Engineered Noble Metal Nanoparticles: Fundamentals and State-of-the-Art of Nanobiotechnology**. 1a. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.

CHEN, J. et al. Transfection efficiency and intracellular fate of polycation liposomes combined with protamine. **Biomaterials**, v. 32, p. 1412-1418, 2011.

CHIRA, S. et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 30675-30703, 2015.

DAVIDSON, A. H. et al. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. **American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 2, p. 240-245, 2005.

DE GARIBAY, A. P. R. Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 166, n. 7, p. 227-235, 2016.

DELONG, R. K. et al. Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. **Biomaterials**, v. 30, p. 6451-6459, 2009.

DELONG, R. K. et al. Biomolecular triconjugates formed between gold, protamine and nucleic acid: comparative characterization on the nanoscale. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

DÖHNER, K.; NAGEL, C.-H.; SODEIK, B. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 320-327, 2005.

EDELSTEIN, M. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. **Site do Journal of Gene Medicine**, 2016. Disponível em: <www.abedia.com/wiley/index.html>. Acesso em: 02 Fevereiro 2017.

EL-SAYED, A.; FUTAKI, S.; HARASHIMA, H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 1, p. 13-22, 2009.

ESCRIOU, V. et al. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1368, n. 2, p. 276-288, 1998.

EVANS, D. F.; WENNESTROM, H. **The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet**. 2ª Edição. ed. [S.l.]: Wiley-VCH, 1999.

FAVARO, M. T. P. et al. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. **Journal of Biotechnology**, v. 173, p. 10-18, 2014.

FERBER, D. Gene therapy: safer and virus-free? **Science**, v. 294, p. 1638-1642, 2001.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Engineering protein self-assembling in protein-based nanomedicines for drug delivery and gene therapy. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 209-221, 2015.

FERRER-MIRALLES, N.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 267-275, 2008.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, p. 20-22, 1973.

GINN, S. L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. **The Journal of Gene Medicine**, v. 15, p. 65-77, 2013.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.

HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. **Food Research International**, v. 27, p. 195-198, 1994.

HORAVA, S. D.; PEPPAS, N. A. Recent advances in hemophilia B therapy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 1-13, 2017.

HUANG, L.; HUNG, M.-C.; WAGNER, E. **Non viral vectors for gene therapy**. [S.l.]: Academic Press, 1999.

Ji, X. et al. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 13939-13948, 2007.

KASZUBA, M. et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 368, p. 4439-4451, 2010.

KHAN, A. K. et al. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 1169-1177, 2014.

KHAN, K. H. DNA vaccines: roles against diseases. **Germes**, v. 3, n. 1, p. 26-35, 2013.

KIM, N. H.; PROVODA, C.; LEE, K.-D. Design and characterization of novel recombinant listeriolysin o-protamine fusion proteins for enhanced gene delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, p. 342-350, 2015.

KONTANI, M. et al. Inhibitory effects of protamines on proteolytic and adhesive activities of porphyromonas gingivalis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4917-4920, 1999.

KUMAR, S.; GANDHI, K. S.; KUMAR, R. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 3128-3136, 2007.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 776-788, 2008.

KYRIAKIS, C. S. Tomorrow's vector vaccines for small ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 181, p. 47-52, 2015.

LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, p. 474-478, 2016.

LECHARDEUR, D. et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. **Gene Therapy**, v. 6, p. 482-497, 1999.

LEOPOLD, P. L.; PFISTER, K. K. Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. **Traffic**, v. 7, p. 516-523, 2006.

LIM, J. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 381, p. 1-14, 2013.

MASTROBATTISTA, E. et al. Artificial viruses: a nanotechnological. **Nature Reviews**, v. 5, p. 115-121, 2006.

MEDINA-KAUWE, L. K.; XIE, J.; HAMM-ALVAREZ, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. **Gene Therapy**, v. 12, p. 1734-1751, 2005.

MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1ª Edição. ed. [S.I.]: Editora ROCA, 2008.

NAYEROSSADAT, N.; MAEDEH, T.; ALI, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. **Advanced Biomedical Research**, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2012.

NIIDOME, T.; HUANG, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. **Gene Therapy**, v. 9, p. 1647-1652, 2002.

NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 277-302, 2000.

OGAWA-GOTO, K. et al. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8541-8547, 2003.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 147-166, 2012.

PEARSON, S.; JIA, H.; KANDACHI, K. China approves first gene therapy. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 3-4, 2004.

PONG, B.-K. et al. New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (iii) salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 6281-6287, 2007.

PURAS, G. et al. Protamine/DNA/niosome ternary nonviral vectors for gene delivery to the retina: the role of protamine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, p. 3658-3671, 2015.

RAMAMOORTHY, M.; NARKEVAR, A. Non viral vectors in gene therapy - an overview. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2015.

REDDING, L.; WEINER, D. B. DNA vaccines in veterinary use. **Expert Reviews Vaccines**, v. 8, n. 9, p. 1251-1276, 2009.

REGALADO, A. Gene Therapy's First Out-and-Out Cure Is Here. **MIT Technology Review**, 2016.

Regulation of DNA vaccines and gene therapy on animals. The Norwegian Biotechnology Advisory Board. [S.I.], p. 10-16. 2013.

ROSENBERG, S. A. et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 1676-1680, 1988.

ROSENBERG, S. A. et al. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 9, p. 570-578, 1990.

ROSENBERG, S. A. et al. The Development of Gene Therapy for the Treatment of Cancer. **Annals of Surgery**, v. 218, n. 4, p. 455-464, 1993.

SANDHU, K. K. et al. Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 13, p. 3-6, 2007.

SASAKI, S. et al. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. **Methods**, v. 31, p. 243-254, 2003.

SILLERO, A.; MALDONADO, A. Isoelectric point determination of proteins and other macromolecules: oscillating method. **Computers in Biology and Medicine**, v. 36, p. 157-166, 2006.

SILVA, D. C. **Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA-protamina-lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica e células de mamífero**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 80. 2015.

- SIVARAMAN, S. K.; KUMAR, S.; SANTHANAM, V. Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - the role of chloroauric acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, p. 543-547, 2011.
- SORGI, F. L.; BHATTACHARYA, S.; HUANG, L. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. **Gene Therapy**, v. 4, p. 961-968, 1997.
- SPERLING, R. A. et al. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Review**, v. 37, p. 1896-1908, 2008.
- STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nature Reviews**, v. 8, p. 195-208, 2007.
- STOLBERG, S. G. The Biotech Death of Jesse Gelsinger. **The New York Times Magazine**, 28 Novembro 1999. 136-140, 149-150.
- SUOMALAINEN, M. et al. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 4, p. 657-672, 1999.
- THACKER, E. L. et al. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 733-742, 2006.
- TOLEDO, M. A. S. et al. Development of a recombinant fusion protein based on the dynein light chain LC8 for non-viral gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 159, p. 222-231, 2012.
- TOLEDO, M. A. S. et al. Characterization of the human dynein light chain Rp3 and its use as a non-viral gene delivery vector. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 3591-3602, 2013.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.
- VAUGHAN, E. E.; DEAN, D. A. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 2, p. 422-428, 2006.
- VÁZQUEZ, E.; FERRER-MIRALLES, N.; VILLAYERDE, A. Peptide-assisted traffic engineering for nonviral gene therapy. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 23/24, p. 1067-1074, 2008.
- WIETHOFF, C. M.; MIDDAUGH, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 2, p. 203-217, 2003.
- WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of Gene Therapy. **Gene**, v. 525, p. 162-169, 2013.
- XU, X.; TAILOR, C.; GRUNEBAUM, E. Gene therapy for primary immune deficiencies: a Canadian perspective. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 13, 2017.
- YLÄ-HERTTUALA, S. Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the european union. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 10, p. 1831-1832, 2012.

ZANTA, M. A.; BELGUISE-VALLADIER, P.; BEHR, J.-P. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 91-96, 1999.

8. ANEXOS

Tabela 9 - Tabela comparativa de ANOVA entre os pares de complexos pDNA:T-Rp3:NPAu. As células que contém um * indicam que a eficiência de transfecção relativa ao par linha e coluna dos complexos é estatisticamente significativa ao nível de 5%.

D _{NPAu}	Prop.	5 nm							21 nm				57 nm			
(nm)	Máss.	1:15:0	1:60:0	1:80:0	1:15:4	1:60:4	1:80:4	1:60:8	1:15:4	1:60:4	1:80:4	1:60:8	1:15:4	1:60:4	1:80:4	1:60:8
5	1:15:0	-		*										*	*	*
	1:60:0		-	*										*	*	*
	1:80:0	*	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
	1:15:4			*	-									*	*	*
	1:60:4			*		-								*	*	*
	1:80:4			*			-							*	*	*
	1:60:8			*				-						*	*	*
21	1:15:4			*					-					*	*	*
	1:60:4			*						-				*	*	*
	1:80:4			*							-			*	*	*
	1:60:8			*								-		*	*	*
57	1:15:4			*									-	*	*	*
	1:60:4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-		
	1:80:4	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*		-	
	1:60:8	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*			-

Tabela 10 - Dados de atividade de luciferase (RLU/mg) não normalizados em relação ao controle de ensaios na presença e ausência de cloroquina e nocodazol. A proporção mássica refere-se ao complexo pDNA-T-Rp3-NPAu.

Proporção mássica	Diâmetro da NPAu (nm)	Condição	Atividade de Luciferase (RLU/mg)
1:60:0	-	Controle	2,03E+06 ± 2,08E+06
1:60:0	-	Cloroquina	6,78E+06 ± 3,47E+06
1:60:4	5	Controle	3,79E+06 ± 1,84E+06
1:60:4	5	Cloroquina	1,47E+05 ± 1,34E+05
1:60:4	60	Controle	6,09E+07 ± 6,59E+06
1:60:4	60	Cloroquina	4,05E+07 ± 3,80E+07
1:60:0	-	Controle (DMSO)	2,14E+06 ± 2,69E+06
1:60:0	-	Nocodazol	1,56E+06 ± 6,40E+05
1:60:4	5	Controle (DMSO)	1,87E+06 ± 4,24E+05
1:60:4	5	Nocodazol	4,95E+05 ± 2,97E+05
1:60:4	60	Controle (DMSO)	9,68E+07 ± 2,57E+07
1:60:4	60	Nocodazol	1,21E+08 ± 4,56E+07