UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CRISTIANE CASONATO MELO

Nanopartículas de quitosana como veículo para entrega
de oligodeoxiribonucleotídeos *antisense*

São Carlos
2018

CRISTIANE CASONATO MELO

Nanopartículas de quitosana como veículo para entrega
de oligodeoxiribonucleotídeos *antisense*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Dra. Juliana Cancino
Bernardi
Co-orientador: Prof. Dr. Valtencir
Zucolotto

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Melo, Cristiane Casonato

Nanopartículas de quitosana como veículo para entrega de oligodeoxiribonucleotídeos *antisense* / Cristiane Casonato Melo; orientadora Juliana Cancino Bernardi; co-orientador Valtencir Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

125 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Quitosana. 2. Oligodeoxiribonucleotídeo antisense. 3. Nanopartículas. 4. Expressão de proteína verde fluorescente. 5. Gelatinização ionotrópica. I. Bernardi, Juliana Cancino, orient. II. Zucolotto, Valtencir, co-orient. III. Título.

*Às pessoas mais importantes da minha
vida, minha família.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me guiado e colocado todas as outras pessoas a quem vou agradecer no meu caminho.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Mauro e Maria José, e ao meu irmão, Fábio, por terem sempre acreditado em mim em todos os momentos e terem sempre apoiado as minhas decisões.

Aos meus avós, Carlos, Terezinha, Antônio e Domingas, por todo o carinho e orações.

Ao meu namorado, Bruno, pela paciência e pela companhia no laboratório durante várias e várias noites e finais de semana. Por ter levado janta e me escutado falando sobre os experimentos.

À todos meus colegas do GNano, Nathalia, Paula, Olavo, Jaque, Adrian, Adislaine, Laís B., Fabrício, Isabela, Edson, Thiers, Val, Romeu, Jaque, Flávia. Em especial à Bianca e Laís Ribovski por todas as conversas, direcionamentos, ajudas experimentais, análises de espectros, almoços, jantares, café, chá, com certeza, sem vocês este trabalho não seria o mesmo. À Camila por ter sido sempre tão solícita e me ajudado, desde Münster.

Aos meus orientadores, Dra. Juliana Cancino Bernardi e Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela orientação e por acreditarem no potencial desse projeto e investirem nele.

Ao Anderson e a Bel pela ajuda com as quitosanas. À Neusa pela ajuda com as referências e formatação.

Às minhas amigas Ana, Estela, Mariane e Marina, por todo o carinho e bons momentos. Ao André pela amizade, conversas e imagens engraçadas.

À Gildete por todas as comidas gostosas, Taís pelas conversas em várias noites de escrita.

Às minhas amigas do outro lado do oceano, Alina, Maria, Marina e Sarona, pelo carinho e amizade mesmo depois de tantos anos.

Ao CNPq e ao IFSC por tornarem possível a realização deste mestrado.

À todos, obrigada, com certeza sem cada um de vocês essa caminhada teria se tornado muito mais difícil.

“Far better it is to dare mighty things, to win glorious triumphs, even though checkered by failure, than to take rank with those poor spirits who neither enjoy much nor suffer much, because they live in the gray twilight that knows neither victory nor defeat.”

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar grandes triunfos, mesmo expondo-se ao fracasso, do que se juntar aos pobres de espírito que nem desfrutam muito, nem sofrem muito, porque vivem nesse entardecer cinzento que não conhece nem vitória nem derrota.”

(Tradução pela autora)

Theodore Roosevelt

RESUMO

MELO, C. C. **Nanopartículas de quitosana como veículo para entrega de oligodeoxiribonucleotídeos *antisense***. 2018. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Em 1978, o trabalho realizado por Stephenson e Zamecnik demonstrou a capacidade de um oligonucleotídeo de impedir a expressão de uma proteína específica. Atualmente, duas tecnologias são mais utilizadas para este propósito: os oligodeoxiribonucleotídeos *antisense* e o RNA de interferência (siRNA), que se aproveitam da capacidade de anelação entre as fitas complementares. A maior diferença entre as duas técnicas é a maquinaria proteica recrutada, isso é, o complexo RISC atua no funcionamento do siRNA, e a protease RNase H atua na clivagem da fita de RNA quando hibridizada com DNA. Apesar da grande aplicabilidade destas tecnologias, tanto para doenças metabólicas quanto para cânceres, o veículo de entrega e proteção dessas sequências é de fundamental importância, visto que a aplicação desses oligonucleotídeos livres está sujeita à rápida degradação e ineficiência. A modificação das bases é uma das estratégias para conferir maior estabilidade às sequências, porém estas tem sido relacionadas a um aumento da toxicidade. Nessa dissertação, a quitosana, um polissacarídeo catiônico é utilizado para síntese de nanopartículas e encapsulamento dos oligodeoxiribonucleotídeos *antisense* (ASO). Para isso, foram realizadas modificações na quitosana comercial como despolimerização, trimetilação ou conjugação com PEG, seguida da síntese das nanopartículas com a adição de tripolifosfato de sódio (TPP) pelo método de gelatinização iônica. A estabilidade das nanopartículas foi medida em função do tempo, da variação de temperatura e da diferença de pH. Além disso, a toxicidade dessas nanopartículas foi analisada através da viabilidade celular em diferentes linhagens, NB-4, HepaRG, HTC e BHK-570. A expressão da proteína verde fluorescente (GFP) na célula NB-4 foi utilizada para avaliar a entrega do ASO desenhado, sendo sua fluorescência monitorada por microscopia confocal. Os resultados demonstram que as nanopartículas se mantiveram estáveis durante o período de tempo analisado, assim como com a temperatura variando de 22 a 45°C e em pH ácido. Cada linhagem celular respondeu de forma diferente ao tratamento com as nanopartículas sem ASO, sendo a linhagem saudável BHK-570 com a maior resistência. Ademais, todas as células apresentaram viabilidade reduzida quando tratadas com concentrações na ordem de 10^{11} nanopartículas/mL a base de quitosana trimetilada. A fluorescência das células NB-4 quando tratada com as nanopartículas com ASO diminuiu consideravelmente nas 18 primeiras horas, seguida de um aumento após 42 horas. Dessa forma, pode-se concluir que as nanopartículas de quitosana propostas nessa dissertação apresentaram uma excelente alternativa para a entrega de material genético, principalmente para o trato gastro-intestinal, devido à sua estabilidade em pH ácido.

Palavras-chave: Quitosana. Oligodeoxiribonucleotídeo *antisense*. Nanopartículas. Expressão de proteína verde fluorescente. Gelatinização iônica.

ABSTRACT

MELO, C. C. **Chitosan nanoparticles as delivery vehicle for antisense oligodeoxyribonucleotides**. 2018. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The property of an oligonucleotide to interfere in the expression of a protein was observed in 1978 by Stephenson and Zamecnik. To perform such interference, there are today, two main techniques being explored: antisense oligodeoxyribonucleotides and interference RNA. In both cases, the particularity of their chemical structure is taken into account as soon as they can bind in a complementary manner to the messenger RNA and inhibit its translation. The great difference between these techniques is related to the proteases involved in the process, while for interference RNA the RISC machinery acts, for antisense oligodeoxyribonucleotides RNase H cleaves the RNA in the duplex DNA-RNA. Although these tools to edit the translation process are relevant to the treatment and even cure of metabolic disorders and cancers, it is still not effective when employed without a coating to protect the sequences before it reaches the destiny *in vivo*. Efforts have been made in developing modified bases to be more stable, but they show some toxicity. In this dissertation, chitosan, a natural cationic polysaccharide, is used to produce nanoparticles to protect the antisense oligodeoxyribonucleotide (ASO). For this reason, the commercial chitosan was modified, depolymerized, trimethylated or PEGylated and the nanoparticles were synthesized with sodium tripolyphosphate (TPP) by ionotropic gelation method. The stability along time, in different pHs and temperatures was assessed. The toxicity of nanoparticles without ASO was quantified by MTT tests in NB-4, HepaRG, HTC and BHK-570 cell lines. A green fluorescent protein (GFP) expressed by NB-4 cells was the target to evaluate the delivery efficiency of the ASO, and its fluorescence was measured by confocal microscopy. Results showed that nanoparticles were stable over time as well as in temperatures ranging from 22 to 45°C and in acidic pH. Each cell line responded in a different manner to the treatment, with the health cell BHK-570 showing higher resistance. Furthermore, all of them presented lower viability when treated with trimethylated chitosan nanoparticles in the highest concentrations (ca 10^{11} nanoparticles/mL). NB-4 cells presented a decrease in fluorescence in 18 hours of treatment followed by an increase after 42 hours. We conclude that chitosan nanoparticles are a good alternative to the delivery of genetic material even more in the gastro intestinal tract due to its great stability in acid pH values.

Keywords: Chitosan. Antisense oligodeoxyribonucleotide. Nanoparticles. Green fluorescent protein expression. Ionotropic gelation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Bases aminadas presentes no DNA. A adenina e a guanina são purinas enquanto a timina e a citosina são pirimidinas. Adenina e timina formam duas ligações de hidrogênio e guanina e citosina três. As posições das ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas vermelhas tracejadas.....	24
Figura 2 –	Esquema básico do funcionamento de uma terapia <i>antisense</i>	27
Figura 3 –	Esquema de um perfil farmacocinético, mostrando a liberação do composto no nível sérico pelo método tradicional (liberação rápida), com necessidade de administração de mais doses, e uma liberação sustentada quando utilizando nanopartículas. O quadro cinza indica a zona terapêutica.....	31
Figura 4 –	Estruturas tradicionais de nanopartículas poliméricas: nanoesferas, as quais apresentam uma matriz polimérica contínua, e nanocápsulas, compostas por um revestimento polimérico de um núcleo aquoso ou oleoso.....	34
Figura 5 –	Estrutura simplificada da quitosana. Composta de unidades de D-glucosamina e de N-acetil-D-glucosamina de forma randômica.....	35
Figura 6 –	Representação esquemática do fluxo de trabalho.....	55
Figura 7 –	Estrutura do RNA mensageiro da GFP de menor energia livre gerado pelo programa RNAstructure com indicação da localização do ASO.....	58
Figura 8 –	Espectro de transmissão no infravermelho de LMW (azul), DSC (vermelho) e DLC (verde).....	62
Figura 9 –	Espectro de ¹ H-NMR da LMW.	63
Figura 10 –	Espectro de ¹ H-NMR da DSC.	63
Figura 11 –	Espectro de ¹ H-NMR da DLC.....	64
Figura 12 –	Espectro de transmissão no infravermelho de LMW (azul) e TMC (roxo).	65
Figura 13 –	Espectro de ¹ H-NMR da TMC.....	66
Figura 14 –	Espectro de transmissão no infravermelho do PEG (preto) e PEG-COOH (laranja).....	67
Figura 15 –	Espectro de ¹ H-NMR (1) PEG, (2) PEG-COOH.....	67

Figura 16 – Espectro de transmissão no infravermelho da LMW (azul) e C-PEG (laranja).	68
Figura 17 – Espectro de ¹ H-NMR da C-PEG.	69
Figura 18 – Tamanho das Nps de LMW (1) e DSC (2) com diferentes concentrações e razões com TPP.	70
Figura 19 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x tempo).	72
Figura 20 – Estabilidade das nanopartículas (potencial zeta x tempo).	73
Figura 21 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x pH).	74
Figura 22 – Estabilidade das nanopartículas (potencial zeta x pH).	75
Figura 23 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x temperatura).	76
Figura 24 – Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas sem ASO. A primeira da esquerda é a Np LMW, à direita Np DSC, no meio à esquerda a Np DLC e à direita Np TMC e na ultima linha está a Np C-PEG centralizada.	79
Figura 25 – Nps em DMEM com 10% de FBS após 24 h de incubação.	81
Figura 26 – Teste de MTT de 18 horas para a linhagem celular NB-4.	86
Figura 27 – Teste de MTT de 42 horas para a linhagem celular NB-4.	86
Figura 28 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular HTC.	87
Figura 29 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular HTC.	88
Figura 30 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular HepaRG.	89
Figura 31 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular HepaRG.	89
Figura 32 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular BHK-570.	90
Figura 33 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular BHK-570.	91
Figura 34 – Imagens de microscopia confocal de 18 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps sem ASO.	94
Figura 35 – Imagens de microscopia confocal de 18 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps com ASO.	95
Figura 36 – Imagens de microscopia confocal de 42 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps sem ASO.	96
Figura 37 – Imagens de microscopia confocal de 42 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps com ASO.	97

Figura 38 – Gráfico da fluorescência relativa das células tratadas com nanopartículas e nanopartículas com ASO. A esquerda são apresentados os dados relativos a 18 horas de tratamento e a direita os relativos a 42 horas.	98
Figura 39 – Segunda estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.	111
Figura 40 – Terceira estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.	112
Figura 41 – Quarta estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.	113
Figura 42 – Quinta estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.	114
Figura 43 – Estabilidade Np LMW (tamanho x pH).	115
Figura 44 – Estabilidade Np DSC (tamanho x pH).	115
Figura 45 – Estabilidade Np DLC (tamanho x pH).	116
Figura 46 – Estabilidade Np TMC (tamanho x pH).	116
Figura 47 – Estabilidade Np C-PEG (tamanho x pH).	117
Figura 48 – Estabilidade Np LMW (potencial zeta x pH).	119
Figura 49 – Estabilidade Np DSC (potencial zeta x pH).	119
Figura 50 – Estabilidade Np DLC (potencial zeta x pH).	120
Figura 51 – Estabilidade Np TMC (potencial zeta x pH).	120
Figura 52 – Estabilidade Np C-PEG (potencial zeta x pH).	121
Figura 53 – Estabilidade Np LMW (tamanho x temperatura).	123
Figura 54 – Estabilidade Np DSC (tamanho x temperatura).	123
Figura 55 – Estabilidade Np DLC (tamanho x temperatura).	124
Figura 56 – Estabilidade Np TMC (tamanho x temperatura).	124
Figura 57 – Estabilidade Np C-PEG (tamanho x temperatura).	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação das energias livres dos ASOs presentes no <i>loop</i> (100, 101, 102 e 103) e do predito mais estável (530). $\Delta G^0_{\text{overall}}$ é a energia livre sem considerar a estrutura e $\Delta G^0_{\text{duplex}}$ é a energia livre considerando a estrutura do RNA mensageiro.....	59
Tabela 2 –	Dados comparativos de medidas de tamanho aferidos por duas técnicas: NTA e DLS.	77
Tabela 3 –	Concentração de proteínas totais calculadas pelo teste BCA para as nanopartículas em meio de cultura RPMI-1640 e DMEM, ambos suplementados com 10% de FBS.	81
Tabela 4 –	Dados de potencial zeta das Nps após incubadas 24 horas em meios de cultura RPMI -1640 e DMEM.	82
Tabela 5 –	Tamanho, Pdl e Potencial Zeta de Np e Np-ASO.	83
Tabela 6 –	Eficiência de encapsulamento do ASO.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
ASO	Oligonucleotídeo <i>antisense</i> de DNA ou oligodeoxiribonucleotídeo
C-PEG	Quitosana conjugada com polietilenoglicol
DLC	Quitosana despolimerizada liofilizada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Quitosana despolimerizada
FTIR	Espectroscopia no infravermelho
GFP	Proteína verde fluorescente
¹ H-NMR	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
LMW	Quitosana comercial de baixo peso molecular
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Np	Nanopartícula
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
TMC	Nanopartícula de quitosana trimetilada
TPP	Tripolifosfato de sódio
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A BASE MOLECULAR DA INFORMAÇÃO GENÉTICA	23
1.1.1	Ácido desoxirribonucleico e replicação	23
1.1.2	Ácido ribonucleico transcrição e tradução	25
1.2	TECNOLOGIA <i>ANTISENSE</i>	26
1.3	NANOTECNOLOGIA	29
1.3.1	Nanomedicina	30
1.3.2	Sistemas poliméricos e a quitosana	33
2	OBJETIVOS	39
3	METODOLOGIA	41
3.1	EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS	41
3.1.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de átomos de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$)	41
3.1.2	Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	41
3.1.3	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)	42
3.1.4	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	43
3.1.5	Potencial zeta	43
3.1.6	<i>Nanoparticle tracking analysis</i> (NTA)	44
3.1.7	Microscopia de força atômica (AFM)	44
3.1.8	Microscopia confocal	44
3.2	DESENHO DO OLIGODEOXIRIBONUCLEOTÍDEO <i>ANTISENSE</i> (ASO)	45
3.3	MODIFICAÇÕES DA QUITOSANA	46
3.3.1	Despolimerização parcial da cadeia polimérica da quitosana	46
3.3.2	Quaternização dos grupo amino da quitosana	47
3.3.3	Conjugação com polietilenoglicol	47
3.4	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	48
3.5	TESTES DE ESTABILIDADE	49
3.5.1	Tamanho e potencial zeta em função do tempo	49
3.5.2	Tamanho e potencial zeta em função do pH	49
3.5.3	Tamanho em função da temperatura	50
3.5.4	Efeito de corona proteica	50

3.6	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	51
3.7	TESTES <i>in vitro</i>	51
3.7.1	Culturas celulares	52
3.7.2	Preparo de amostras para ensaios celulares	52
3.7.3	Ensaio de viabilidade celular	53
3.7.4	Análise de fluorescência por microscopia confocal	54
3.8	RESUMO GRÁFICO	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	DESENHO DO OLIGODEOXIRIBONUCLEOTÍDEO <i>ANTISENSE</i> (ASO).....	57
4.2	MODIFICAÇÕES DA QUITOSANA.....	60
4.2.1	Despolimerização parcial da cadeia polimérica da quitosana	60
4.2.2	Quaternização dos grupo amino da quitosana	64
4.2.3	Conjugação com polietilenoglicol	66
4.3	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	69
4.4	TESTES DE ESTABILIDADE.....	71
4.4.1	Tamanho e potencial zeta em função do tempo	71
4.4.2	Tamanho e potencial zeta em função do pH	74
4.4.3	Tamanho em função da temperatura	76
4.4.4	Análise de tamanho por NTA	77
4.4.5	Análise de tamanho por AFM	79
4.4.6	Efeito de corona proteica	80
4.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	83
4.6	TESTES <i>in vitro</i>	85
4.6.1	Ensaio de viabilidade celular	85
4.6.2	Análise de fluorescência por microscopia confocal	93
5	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A	111
	ANEXO B	115
	ANEXO C	119
	ANEXO D	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BASE MOLECULAR DA INFORMAÇÃO GENÉTICA

Todos os organismos vivos possuem uma carga genética determinada pela sequência de bases em seus cromossomos. Essa carga genética é responsável pela síntese de proteínas e, conseqüentemente, pelo controle da maioria das atividades fisiológicas. Portanto, uma sequência de bases erradas pode levar à doenças metabólicas, como a hemocromatose hereditária ou o câncer.

As doenças metabólicas hereditárias são de difícil tratamento, especialmente por terapias convencionais. Nesse sentido, a terapia *antisense* é uma das estratégias mais sofisticadas e de melhor desempenho para essa finalidade. A seguir, serão apresentados os conceitos básicos para o entendimento dos mecanismos moleculares explorados por trás da terapia *antisense* bem como seu mecanismo de ação.

1.1.1 Ácido desoxirribonucleico e replicação

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a estrutura responsável por armazenar e transmitir a informação genética. Ele é formado por oligonucleotídeos, os quais, por sua vez, são compostos de um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas no DNA podem ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). Elas são agrupadas em purinas, A e G, e pirimidinas, T e C. (1-2) Apesar das proporções entre as bases ter sido proposta por Erwin Chargaff em 1950, foi apenas em 1953 que a teoria da dupla hélice de DNA foi proposta por Watson e Crick através de uma publicação na revista *Nature*. (1,3)

O pareamento ocorre sempre entre uma purina e uma pirimidina, A com T e G com C, isto porque as purinas possuem dois anéis enquanto as pirimidinas possuem apenas um; com esse pareamento a distância entre as fitas de uma dupla hélice se mantém constante. (1) A **Figura 1** ilustra esse pareamento, e também indica onde se formam as ligações de hidrogênio, responsáveis por manter a coesão entre as fitas. A e T pareiam com apenas 2 ligações, enquanto C e G com 3. (1)

O DNA possui a capacidade de se replicar em um processo semiconservativo, ou seja, cada fita serve como molde para uma fita complementar, originando uma dupla hélice idêntica a original, porém com uma fita recém sintetizada e uma que foi utilizada como molde. (1) A replicação do DNA é um processo de polimerização dos nucleotídeos que ocorre no sentido do carbono 5 do açúcar para o 3 ($5' \rightarrow 3'$) com a atuação da DNA polimerase III. (1) Porém, quando a dupla fita se abre, uma das fitas está no sentido correto (fita *leading*), e a outra vai desenrolando no sentido $3' \rightarrow 5'$ (fita *lagging*). Para transpor este inconveniente, pequenos *primers* de RNA se anelam no sentido $5' \rightarrow 3'$ e a DNA polimerase prossegue até encontrar o início do próximo *primer* e assim sucessivamente. Cada fragmento deste (*primer* de RNA + sequência de DNA sintetizada) é chamada de Fragmento de Okasaki. O *duplex* DNA-RNA (fita molde – *primer* da fita recém sintetizada, respectivamente), recruta proteases e o RNA é clivado, a sequência referente ao comprimento deste *primer* é sintetizado pela DNA polimerase I e ligada pela DNA ligase ao restante da molécula. (1)

Figura 1 – Bases aminadas presentes no DNA. A adenina e a guanina são purinas enquanto a timina e a citosina são pirimidinas. Adenina e timina formam duas ligações de hidrogênio e guanina e citosina três. As posições das ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas vermelhas tracejadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A existência dos fragmentos de Okasaki é fundamental para uma terapia *antisense* com oligodeoxinucleotídeos já que esta se baseia em uma pequena hibridização de DNA com RNA e esse mecanismo de clivagem será abordado mais adiante.

1.1.2 Ácido ribonucleico transcrição e tradução

O ácido ribonucleico (RNA), diferentemente do DNA, é formado pelo açúcar ribose, que possui um grupamento hidroxila no carbono 2. Ele aparece na forma de fita simples, o que o torna mais flexível e permite a formação de estruturas com interações intramoleculares. Além disso, possui a base nitrogenada uracila (U) no lugar da timina, a qual, além de formar ligações de hidrogênio com a adenina, é capaz de formar 2 ligações mais fracas com a guanina. Este fenômeno é importante na estruturação do RNA. Outra propriedade particular do RNA é a capacidade de catalisar reações biológicas como as enzimas (essas moléculas são então chamadas de ribozimas). (4)

O RNA é o intermediário que leva a informação do núcleo da célula para o citoplasma onde é traduzido em aminoácidos, dando origem às proteínas. Para tanto, inicialmente ocorre a transcrição do DNA, este processo também ocorre no sentido $5' \rightarrow 3'$, ou seja, adicionando os ribonucleotídeos sempre na extremidade $3'$ e utilizando a fita $3' \rightarrow 5'$ do DNA como molde, sendo a RNA polimerase II a enzima atuante nesse processo. O RNA formado chama-se pré-mRNA ou transcrito primário, o qual sofre processamentos antes de sair do núcleo, como o revestimento na ponta $5'$, a recombinação com eliminação de *íntrons* e a poliadenilação da extremidade $3'$. Depois destes processos o RNA passa a se chamar RNA mensageiro (mRNA). (4)

A chamada sequência codificante é a fita do DNA que não é usada como molde, portanto as bases desta são iguais as do mRNA, exceto pela troca da timina para uracila e retirada dos *íntrons*. Quando proteínas que não são integrantes no genoma de eucarioto são visadas, a sequência do plasmídeo inserido para promover a expressão não possui *íntrons*, como é o caso da proteína verde fluorescente utilizada como repórter neste trabalho.

O mRNA é transportado para o citoplasma, onde é traduzido em proteínas. Cada trinca de bases do mRNA é chamada de códon e sinaliza um aminoácido,

porém mais de um códon pode sinalizar para o mesmo aminoácido, sendo, portanto, um código degenerado. Existem outras moléculas de RNA que são chamadas de RNA funcionais; o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA) pertencem a esta classe. O primeiro é o responsável por fazer a adaptação do códon do mRNA para o aminoácido específico através de um anti-códon. O anti-códon nada mais é do que uma sequência complementar ao códon em uma alça no tRNA que pareia com o códon no mRNA. Os rRNAs são componentes fundamentais dos ribossomos, o qual consiste de uma unidade pequena (40S) e uma grande (60S) formadas de RNA e proteínas, esta estrutura é essencial para associar o mRNA com os tRNA corretos e promover as ligações peptídicas entre os aminoácidos. (5)

1.2 TECNOLOGIA *ANTISENSE*

A tecnologia *antisense* se baseia na capacidade de hibridização das bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos, esse mecanismo é empregado naturalmente no corpo humano para a regulação da atividade gênica e estima-se que entre 5-10% do genoma humano apresente transcritos *antisense*. (6-7) Em 1978 Zamecnik e Stephenson publicaram um artigo relatando que através de um oligodeoxiribonucleotídeo de 13 bases, conseguiram alcançar um efeito antiviral do retrovirus *Rous sarcoma* em fibroblasto embrionário de galinha. Além disso, eles propõem possíveis sítios de atuação deste oligodeoxiribonucleotídeo *antisense* (ASO). (6,8)

O projeto Genoma Humano foi um consórcio de diversos institutos de pesquisa no mundo que determinou as sequências de bases do DNA humano. (9) A partir dessas sequências, se tornou possível o estudo da função gênica, o qual se beneficiou do avanço nas tecnologias *antisense* e siRNA, tornando-as ferramentas fundamentais na pesquisa e com possíveis aplicações terapêuticas. (10)

Trata-se, portanto, de uma nova classe farmacológica, na qual um oligonucleotídeo é desenhado para inibir a produção de uma proteína específica. Entretanto, alguns fatores precisam ser levados em consideração, como a estrutura do RNA mensageiro, o metabolismo deste, os sítios de expressão, entre outros. (6) Um esquema básico do funcionamento das classes mais tradicionais de terapia *antisense* é apresentado na **Figura 2**. Resumidamente, o gene é transcrito

normalmente e ocorre o processamento, então o RNA ou DNA utilizado como oligonucleotídeo *antisense* hibridiza e recruta a maquinaria de clivagem bloqueando a tradução do mRNA.

Figura 2 – Esquema básico do funcionamento de uma terapia *antisense*.
Fonte: Elaborada pela autora.

A hibridização do oligonucleotídeo ao mRNA ocorre principalmente devido à energia livre liberada das ligações de hidrogênio formadas e do empilhamento das bases na dupla hélice, conferindo maior estabilidade à estrutura. A afinidade entre as sequências é influenciada pelo comprimento e pela sequência de bases, além da força iônica do meio. É importante também saber a estrutura secundária do mRNA e a conformação do oligonucleotídeo *antisense* utilizado, visto que, o primeiro pode se dobrar formando regiões inacessíveis para a hibridização e o segundo, caso exista alguma complementariedade entre as suas próprias moléculas, pode interferir no processo por já se encontrarem na forma de *duplex*. (6,11) Normalmente, para a definição de uma sequência ideal são utilizados algoritmos computadorizados os quais retornam possíveis 40-80 opções, as quais são então testadas *in vitro*, originando respostas celulares diferentes. (6)

O termo oligonucleotídeo pode ser usado genericamente tanto para oligodeoxiribonucleotídeos como oligoribonucleotídeos e apesar de ambos terem capacidade de gerar uma resposta *antisense* a um mRNA, os mecanismos moleculares por trás são diferentes. Os oligodeoxiribonucleotídeos *antisense* ou

ASOs são fitas simples de DNA com aproximadamente 20 bases e que atuam recrutando a RNase H, presente tanto no citosplasma quanto no núcleo celular. Por sua vez, os oligoribonucleotídeos *antisense* ou *small interfering RNA* ou siRNA são geralmente composto de uma fita dupla, sendo a fita *sense* presente para aumentar a estabilidade. As enzimas atuantes nesse processo são a Dicer e o complexo indutor de silenciamento-RNA (RISC), presente no citoplasma. Uma grande desvantagem do siRNA é que a fita *sense* que deveria ser descartada no processo, pode atuar em outros mRNA causando reações adversas; além disso, sequências complementares e parcialmente complementares podem gerar respostas diferentes devido à promiscuidade desse complexo enzimático, estas reações indesejadas podem ser genericamente denominadas *off-targets* e já foram descritas por diversos grupos. (6,12-13) Achenbach et al. compararam as duas metodologias de silenciamento, elucidando prós e contras de cada uma, assim como suas semelhanças e diferenças, mas sugeriram que para aqueles que pretendem uma aplicação *in vivo* o ASO seria a melhor escolha. (14)

Tanto os ASOs quanto os siRNA podem ser usados em estudos tanto de doenças metabólicas como de câncer. (15) Recentemente, foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) um oligonucleotídeo *antisense* que atua na recombinação do mRNA, para aumentar a expressão de uma proteína deficiente em pacientes com atrofia muscular espinhal, mostrando a versatilidade e capacidade da terapia *antisense*. (16)

O apatorsen é um oligonucleotídeo *antisense* de segunda geração para a *Heat shock protein 27* (Hsp27), esta proteína está associada à disfunção da morte celular por apoptose. (17) Ele encontra-se em testes clínicos para cânceres de próstata, ovário, mamas, bexiga e pulmão. (17) Shimada et al. demonstraram que sua utilização também é viável em células de câncer de colo retal (linhagem SW480) quando administrado com *Lipofectamina 3000*, pois além de diminuir a expressão da proteína Hsp27, diminui a resistência à 5-fluorouracil. (17) Ademais, eles mostraram que os dados de inibição da tradução proteica *in vivo* são melhores do que sua inibição *in vitro*, e sugerem que isso ocorre devido ao tempo experimental ser mais limitado nos ensaios *in vitro*. (17) A utilização de um ASO para diversos tipos de câncer está sujeita a expressão da proteína em questão naquele tecido.

A atividade dos ASOs depende da sua entrega nas células ou tecido de forma adequada, sendo muito importante que o vetor de entrega preserve o ASO até o

destino e que não apresente citotoxicidade. (18) Os estudos iniciais de inibição não utilizavam veículos de entrega, entretanto, esta prática não é adequada às aplicações clínicas, visto que a meia vida de oligonucleotídeos na corrente sanguínea é de poucos minutos. Além disso, modificações químicas na cadeia polimérica dos ASOs para aumentar o tempo de meia vida e sua estabilidade em soro podem causar toxicidade ao paciente. (14,19-20) Os vetores virais são naturalmente transportadores de material genético, entretanto, podem causar toxicidade, respostas imunes, apresentar potencial oncogênico e ainda seria um processo difícil para aumentar a escala para proporções comerciais. (15,18) Por conseguinte, como forma alternativa de veículo de entrega, lipossomos e polímeros catiônicos vêm sendo empregados. O próximo tópico abordará este tema.

Nesta dissertação, busca-se a redução da tradução do mRNA de uma proteína repórter, uma proteína verde fluorescente (GFP). Esta proteína não é natural da linhagem celular utilizada e isso significa que ela não possui funções fisiológicas e, portanto, sua ausência ou presença não altera o transcriptoma. (21)

1.3 NANOTECNOLOGIA

O termo nanotecnologia tem se tornado cada vez mais frequente, sua abrangência é bem ampla, estando presente na eletrônica, fotônica, materiais condutores, sensores, medicina, biotecnologia, entre outros. (22) Sabe-se que de 2000 a 2014 o número de publicações no PubMed com o termo “nanopartícula” praticamente dobrou a cada 2 anos. (23) Existem diferentes concepções sobre o que é considerado uma nanopartícula, alguns consideram como sistemas sólidos coloidais de 1 a 1000 nm de diâmetro. (24) Entretanto, a maior diferença entre os materiais reside no fato de esses sistemas nanoestruturados apresentarem propriedades físico-químicas diferentes daquelas presentes em sua forma macroestruturada; isso ocorre, principalmente devido à sua maior relação superfície-volume. (25) Existem nanoestruturas dos mais diversos materiais e até mesmo os mesmos materiais podem dar origem a diferentes estruturas dependendo das suas rotas sintéticas, como exemplo tem-se as nanopartículas de ouro de estrutura esférica e nanobastões, cilíndricos, os quais apresentam propriedades físicas diferentes e que podem ser exploradas. (25-26)

1.3.1 Nanomedicina

A nanomedicina é uma parte da nanotecnologia que busca soluções e inovações na área médica, tanto para terapia quanto para o diagnóstico. (25) Essa junção de áreas se torna muito interessante em vista da grande quantidade de processos biológicos que ocorrem na escala nanométrica. (25) A terapia com métodos tradicionais possui algumas desvantagens como os efeitos adversos resultantes da administração sistêmica do fármaco sem um real direcionamento do mesmo e, portanto, em concentrações mais altas. (28) Este tipo de situação pode potencialmente ser contornado com o emprego de nanopartículas, isso é um sistema carreador do ativo que seja nanoestruturado. (29)

A entrega de medicamento, ou em inglês *drug delivery*, se refere a aplicação de nanopartículas como veículo para transporte de ativos. Nesse caso, as nanopartículas auxiliam na administração e entrega de fármacos, DNA, siRNA, entre outros ativos, visando atingir concentrações e tecidos adequados, obter uma liberação controlada e protegê-los de possíveis degradações. (30–32) Desta forma, espera-se obter uma maior biodisponibilidade, eficiência terapêutica e menor toxicidade. (25) A **Figura 3** representa como deve ser a variação de uma determinada droga nos níveis séricos (farmacocinética) quando administradas por uma das vias tradicionais (liberação rápida), e quando administrada na formulação com nanopartículas. (33) Na liberação tradicional exemplificada, ocorre uma rápida liberação do ativo em um curto espaço de tempo até um máximo de concentração, seguida de uma queda abrupta dos níveis, tornando necessária a administração de uma nova dose para que se mantenha a eficiência terapêutica. Quando o ativo é administrado via nanopartículas, a ideia é que a concentração liberada do ativo permaneça na zona terapêutica o maior tempo possível, isso é, atinge-se lentamente uma concentração máxima que se mantém por um longo período de tempo até sua redução. As nanopartículas permitem essa abordagem, pois a droga que está em seu interior é usualmente liberada por difusão ou erosão do material de maneira lenta. (34)

Figura 3 – Esquema de um perfil farmacocinético, mostrando a liberação do composto no nível sérico pelo método tradicional (liberação rápida), com necessidade de administração de mais doses, e uma liberação sustentada quando utilizando nanopartículas. O quadro cinza indica a zona terapêutica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, esses veículos de entrega devem apresentar características especiais para que seus objetivos sejam atendidos, como tamanho, forma, carga superficial, material e revestimento. (28,32) Por conseguinte, é preciso saber a aplicação antes do desenvolvimento, para que a nanopartícula seja projetada para um determinado tipo de administração levando em consideração fatores fisiológicos como pH ou mesmo as características do tecido alvo. Muitas das nanopartículas já disponíveis no mercado ou que estão em teste clínico são desenvolvidas para o diagnóstico e tratamento de câncer, com o principal objetivo de superar a resistência de medicamento que o organismo desenvolve após um determinado tempo de quimioterapia. (27,35) Sabe-se que, como alguns receptores são superexpressos em células específicas ou tumorais, por exemplo, o receptor de transferrina, é possível projetar uma nanopartícula de forma a apresentar em sua superfície proteínas para um biorreconhecimento adequado. (27,28,36) Davis et al. desenvolveram uma nanopartícula de ciclodextrina com transferrina humana e polietileno glicol (PEG) na superfície para entrega de siRNA específico para a subunidade M2 da redutase de ribonucleotídeos para administração intravenosa. Eles observaram através da análise das biópsias dos voluntários dos testes clínicos que as nanopartículas se localizavam apenas no melanoma e não nos tecidos adjacentes. (19)

Existem inúmeros estudos de nanopartículas aplicadas no tratamento de tumores sólidos, como o descrito acima. Além de possuir modificações na superfície para identificação das células tumorais, as nanopartículas acumulam preferencialmente nestes tecidos devido à grande vascularização e pouca drenagem, efeito conhecido como *enhanced permeability and retention effect* (EPR), o que torna muito atrativa a aplicação das nanopartículas tanto para entrega de quimioterápicos, como para terapia fotodinâmica e associação com siRNA ou ASO. (23)

Apesar de outras doenças não se valerem desta condição de EPR, ainda é possível a utilização de marcadores na superfície do nanomaterial para o tipo celular a ser tratado. Além disso, as características citadas acima, tamanho, forma, carga superficial, material e revestimento determinam o tempo de circulação, no caso de administração intravenosa, a farmacocinética e o modo de internalização celular. (28)

Sabe-se que a introdução de nanopartículas em sistemas biológicos pode ser acompanhada do seu recobrimento por proteínas do plasma, efeito conhecido como, corona proteica que ocorre de forma diferencial, dependendo das características das nanopartículas. (23,37) A corona proteica pode muitas vezes alterar as propriedades e estabilidade do nanomaterial, fornecendo assim uma nova identidade, que pode influenciar na biocompatibilidade ou mesmo no reconhecimento imunológico. (23,37) Quando esta corona é formada por opsoninas, o sistema reticuloendotelial é logo requisitado. Algumas proteínas ajudam na diminuição desse efeito e, consequentemente, no aumento da circulação. (30,37) A presença do PEG está associada à redução da interação de proteínas não específicas devido à repulsão estérica, portanto, sua conjugação com o nanomaterial pode ser uma estratégia de aumento da circulação. (37)

Igualmente importante, são os tecidos alvo já que também influenciam na eficácia e eficiência da entrega. As células possuem tamanhos, formas e funções variáveis. Em sua maioria apresentam tamanhos entre 2 e 120 μm , por exemplo, as células tronco hematopoiéticas possuem tamanho entre 30 e 40 μm ; macrófagos, entre 20 e 80 μm ; linfócitos, entre 6 e 12 μm ; fibroblastos, 10 a 15 μm ; células do fígado aproximadamente 20 μm . (38) Existem células de natureza aderente e outras não-aderentes. As características celulares influenciam no modo de internalização e também na resposta celular.

Os principais meios de internalização ou endocitose são a fagocitose, realizada por algumas células hematopoiéticas para capturas de partículas maiores, e a pinocitose, que ocorre em todos os tipos celulares para captura de pequenas partículas, fluidos e solutos. (28)

Por fim, é importante ressaltar que as indústrias farmacêuticas reconhecem a importância dessas nanopartículas, e por isso, muitas delas tem se dedicado aos estudos nessa área, sendo que cerca de US\$ 479.752 milhões de dólares serão investidos nessa área até 2024, de acordo com Batista et al. (39) Diversos materiais são estudados para a entrega de DNA e RNA como os lipossomos, sílica mesoporosa, polímeros e até mesmo híbridos desses materiais. (40-44) Como os sistemas poliméricos tem se destacado, principalmente por muitos serem naturais e de baixo custo, eles serão discutidos no próximo tópico.

1.3.2 Sistemas poliméricos e a quitosana

Muitas vezes, o desenvolvimento e a utilização de novas drogas está limitado a sua baixa solubilidade, estabilidade e biodistribuição no sistema biológico. Com isso, há um crescente interesse no desenvolvimento de métodos de entrega de fármacos que minimizem esses problemas e possam ser administrados por vias menos invasivas. Neste cenário, as nano e micropartículas poliméricas vêm sendo muito estudadas. (34)

Para tanto estes materiais devem ser atóxicos, não imunogênicos, carregar uma quantidade adequada do fármaco e liberar de forma rápida ou lenta, dependendo da aplicação desejada. (45) É interessante ressaltar que a liberação sustentada e lenta apresentada na **Figura 3** é uma das características principais do uso dos nanocarreadores. Além disso, a capacidade de alguns materiais responderem a estímulos externos (nanopartículas que respondem de maneira inteligente) e liberarem todo seu material rapidamente é também interessante para diversas aplicações. (32) A grande maioria dessas características é encontrada em sistemas poliméricos.

A palavra polímero vem da junção de *poli* que significa muitos e *mero* que se refere a unidade, ou seja, é uma molécula formada pela junção de muitas unidades menores, os monômeros. (46) Essas unidades menores podem ser iguais ou diferentes, como no caso das proteínas e ácidos nucleicos, os quais são compostos

de vários monômeros diferentes. Quando mais de um tipo de unidade de repetição é utilizada, pode se chamar o polímero de copolímero. (46) O grau de polimerização se refere ao número de monômeros que compõem determinada molécula. (46) Quanto a origem eles podem ser naturais, semi-sintéticos ou sintéticos. (46)

Existem diversas formas de sintetizar as nanopartículas poliméricas, como gelatinização ionotrópica, nanoprecipitação, *salting-out*, nanoemulsão, entre outros, e os tipos de nanosistemas mais comuns são os apresentados na **Figura 4**. (30,41-42) As nanoesferas são compostas inteiramente por uma matriz polimérica, sem diferenciação entre um núcleo. Neste sistema os compostos são adsorvidos na superfície ou ficam retidos dentro da matriz. A segunda estrutura mais usual é a de nanocápsulas, nelas, o polímero funciona como um revestimento para um núcleo aquoso ou oleoso no qual a droga se encontra. (22)

Figura 4 – Estruturas tradicionais de nanopartículas poliméricas: nanoesferas, as quais apresentam uma matriz polimérica contínua, e nanocápsulas, compostas por um revestimento polimérico de um núcleo aquoso ou oleoso.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as inúmeras opções de polímeros para o desenvolvimento de nanopartículas, está a quitosana. A quitosana é um polissacarídeo natural que pode ser adquirido a partir da desacetilação parcial da quitina, a qual é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, constituindo exoesqueletos de artrópodes e parede celular de vários fungos. (49–51) A quitosana apresenta características muito interessantes para a indústria farmacêutica, como biocompatibilidade, mucoadesão, biodegradabilidade, além de aumentar a absorção de drogas hidrofílicas. (43-44)

Entretanto, o termo genérico quitosana se refere a uma gama de polímeros de diferentes graus de acetilação, peso molecular e estrutura da cadeia os quais podem

apresentar diferentes respostas biológicas e de eficiência de encapsulamento, gerando, portanto, resultados muitas vezes contraditórios na literatura. (43-44) A quitosana pode aparecer na conformação α , quando originada da α -quitina presente em estruturas mais rígidas, a cutícula de camarões e caranguejos, e β , da β -quitina, de estruturas mais flexíveis como os gládios de lula. A diferença destas estruturas é decorrente da disposição das cadeias nas lamelas do domínio cristalino, sendo na α as cadeias organizadas de forma antiparalela, favorecendo as ligações de hidrogênio intra e inter moleculares e a β organizada de forma paralela, dificultando as interações. Isso influencia muito nos resultados, apesar de ser raramente apresentado nos trabalhos de forma explícita a origem do material utilizado. (46-47)

Geralmente, esse polímero possui um valor de pK_a próximo de 6,5, ou seja, em soluções ácidas, seus grupo amino estão carregados positivamente e, portanto, são cadeias policatiónicas, as quais interagem com moléculas negativas facilmente. (49) A interação eletrostática é também a responsável pela interação com a superfície das mucosas, que é carregada negativamente promovendo uma abertura reversível das junções oclusivas, e assim, acelerando a transferência do composto que estiver transportando. (15,30) A quitosana é formada por unidades randômicas de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina e apresenta ligações β 1 $\rightarrow$ 4, como mostrado na **Figura 5**. (15) Esse tipo de ligação é também presente nas fibras dietéticas, como a celulose. (54)

Figura 5 – Estrutura simplificada da quitosana. Composta de unidades de D-glucosamina e de N-acetil-D-glucosamina de forma randômica.

Fonte: Elaborada pela autora

A propriedade de mucoadesão da quitosana a torna interessante principalmente para entregas nasais, orais, oculares e intestinais. Estas outras rotas de administração possibilitariam que o próprio paciente se medicasse com

tratamentos que anteriormente demandavam pessoal especializado para administração intravenosa. Isso pode aumentar a adesão aos tratamentos devido à independência e por serem rotas menos invasivas. (15,24,39) Como exemplo, Vila et al. exploraram essa característica da quitosana para a entrega nasal de nanopartículas com insulina, observando um aumento na absorção desta proteína por coelhos. (34) O epitélio intestinal é um tecido especializado em absorção, portanto, também é interessante utilizar esta via como forma de aumentar a biodisponibilidade. (39)

Existem várias rotas de síntese de nanopartículas de quitosana, entretanto, o peso molecular, a estrutura química, e o grau de acetilação, também possuem relação com o tamanho final da nanopartícula. (30) No caso de Vila et al. as nanopartículas foram produzidas pela técnica de gelatinização ionotrópica com tripolifosfato de sódio, um poliânion, e uma quitosana de tamanho maior do que 50 kDa, resultando em nanopartículas de tamanho entre 300 e 400 nm. (34) Os autores ressaltam que as nanopartículas de quitosana são uma alternativa à utilização de nanopartículas de PLA que utilizam solventes orgânicos potencialmente perigosos em sua síntese. (34)

Pesquisas com quitosana são feitas para encapsulamento de antibióticos para bactérias resistentes, como agentes antimicrobianos por si só, para complexação com materiais genéticos, encapsulamento de substâncias nutracêuticas, imobilização de enzimas, tratamento de água e até mesmo para tratamentos em derramamento de óleo, mostrando sua ampla gama de aplicações. (55–61) De 1976 a 2006 foram registradas 5946 patentes relacionadas à quitosana no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), estes dados demonstram o grande potencial da utilização desse polímero. (53) Entretanto, quando é feita a busca por “*chitosan nanoparticles*” no USPTO de 1976 até hoje, este número é reduzido para 367, indicando que seu emprego na forma de nanopartículas ainda tem muito para ser explorado. (62) O grande potencial da quitosana está diretamente associado ao fato de ser um polímero catiônico natural caracterizado pelo baixo custo e baixa toxicidade.

Considerando todas as particularidades da quitosana, ela se apresenta como um polímero adequado para o carregamento de oligonucleotídeos para terapias *antisense*. Doenças como a hemocromatose hereditária podem ser muito beneficiadas com o desenvolvimento de veículos de entrega de ASO a base de

quitosana, devido à sua potencial estabilidade em pH ácido, o que proporciona uma entrega adequada do material no intestino onde ocorre a absorção do ferro.

Além disso, a administração por meio de nanopartículas de quitosana pode aumentar a eficiência terapêutica sem modificações nas bases aminadas do ASO. Sendo assim, a medicina personalizada pode ser alcançada com o encapsulamento de ASOs individualizados, dependendo apenas do genoma do paciente, e garantindo um tratamento mais eficiente com menos efeitos colaterais. Deste modo, foi utilizada a quitosana como base polimérica na síntese das nanopartículas para encapsulamento de um oligodeoxiribonucleotídeo específico para uma proteína verde fluorescente, a qual serve como controle para análise da eficiência de encapsulamento e entrega do ASO.

2 OBJETIVOS

Essa dissertação teve como objetivo a confecção de nanopartículas de quitosana com oligonucleotídeos de DNA *antisense* (ASO) encapsulados. Desta forma procurou-se alcançar a entrega deste material de forma eficiente e segura para as células, possibilitando sua posterior utilização em metodologias terapêuticas. Para atingir este objetivo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Desenhar o ASO para uma proteína verde fluorescente que atua como repórter;
- Modificar a quitosana de baixo peso molecular comercialmente disponível: trimetilação de seus grupos amino, despolimerização parcial de sua cadeia polimérica e conjugação da quitosana com polietilenoglicol;
- Determinar a melhor formulação para as nanopartículas, considerando tanto a concentração de quitosana quanto a relação com o agente reticulante;
- Caracterizar as nanopartículas da quitosana convencional e das modificadas, testando, assim, sua estabilidade em função do pH, temperatura e tempo;
- Comparar os métodos de DLS com NTA e AFM para análise de tamanho das nanopartículas sem ASO;
- Verificar a formação de corona proteica pelas proteínas dos meios de cultura utilizados;
- Analisar a eficiência de encapsulamento do ASO na formulação escolhida;
- Realizar ensaios de citotoxicidade das nanopartículas sem ASO em diferentes linhagens celulares;
- Analisar a fluorescência das células produtoras da proteína verde fluorescente após tratamento com nanopartículas com e sem ASO.

3 METODOLOGIA

3.1 EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

Nessa seção serão apresentadas as principais técnicas e equipamentos utilizados nessa dissertação, posteriormente serão citadas suas aplicações.

3.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de átomos de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$)

O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre em núcleos com massa e/ou número atômicos ímpares devido à uma propriedade denominada *spin*. (63) A ressonância ocorre quando núcleos alinhados com o campo magnético aplicado são induzidos a mudar de orientação em virtude da absorção de energia. (63) Como a frequência de ressonância de prótons em ambientes químicos diversos é diferente, torna-se possível a obtenção de dados sobre o número destes átomos magneticamente distintos. (63) Essa é uma técnica importante para determinações estruturais de compostos e composição química.

As análises de $^1\text{H-NMR}$ foram realizadas no equipamento Bruker AVANCE III (400 MHz) com ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS) como referência externa. Mesmo com a utilização de água deuterada, o sinal da água pode interferir na medida, portanto a sequência de pulso “ZGCPPR” foi utilizada para suprimir os sinais de hidrogênio da água. (64) Os dados de $^1\text{H-NMR}$ foram analisados pela Dra. Bianca Estevão.

3.1.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho se baseia na capacidade das ligações com variação do momento de dipolo de absorver a energia dos comprimentos de onda do infravermelho e atingirem um estado de maior energia, a qual provoca uma ampliação dos movimentos vibracionais nas moléculas. (65) Através do espectro gerado é possível obter informações sobre o tipo de ligação e os grupos funcionais da amostra. (65)

Para as análises de FTIR, foi utilizado o modo transmitância utilizando silício como substrato para a formação dos filmes. O aparelho utilizado foi o Espectrômetro Nicolet 6700/GRAMS Suite, resolução de 4 cm^{-1} .

3.1.3 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia no UV-Vis se caracteriza pela capacidade das moléculas de absorver a energia da radiação no comprimento de onda do UV-Vis, o que está diretamente relacionado com uma mudança do nível de energia eletrônico, ou seja, os elétrons são promovidos a orbitais de energia maior. Normalmente a mudança ocorre de um orbital ocupado de energia maior para um orbital desocupado de energia menor. (66) Os efeitos dessa absorção da energia radiante tem relação direta com a concentração da espécie, através da lei de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

sendo:

A : absorbância

I_0 : Intensidade de luz incidindo na cubeta

I : Intensidade de luz saindo da cubeta

ε : absortividade da espécie

c : concentração do soluto

l : comprimento da cubeta (cm)

É possível observar que a absorbância em um dado comprimento de onda é proporcional à concentração do soluto. Portanto, essa é uma técnica muito utilizada para a construção de curvas de calibração e quantificação de amostras.

Foram utilizados dois equipamentos para análise de absorbância no UV-Vis: U-2900 Spectrophotometer da Hitachi com cubeta de quartzo Hellma Analytics 10x2 mm e o equipamento Spectra Max M3 da Molecular Devices para a leitura das placas de cultura com 96 poços.

3.1.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico também é conhecido como espectroscopia de correlação de fóton. Nessa técnica o movimento Browniano é associado ao tamanho das partículas, ao raio hidrodinâmico, através da flutuação da intensidade de luz espalhada pela amostra analisada. (67)

As análises de tamanho por DLS foram realizados no Zetasizer Nano ZS-90 da Malvern. Variações de tamanho em relação ao pH foram realizadas utilizando-se o MPT-2 Multi-Purpose Titrator, também da Malvern, acoplado ao Zetasizer Nano ZS-90. Foi escolhido o Z-average como medida de tamanho, pois é a medida mais estável da técnica e é a requerida para medidas de controle de qualidade. (68)

3.1.5 Potencial zeta

O potencial zeta é medido através da mobilidade eletroforética das partículas em solução. As Nps quando em solução, são circundadas por contra-íons, sendo essa camada dividida em camada *Stern*, que é fortemente ligada e camada difusa, que é fracamente ligada; formando assim uma dupla camada elétrica. Quando um potencial elétrico é aplicado, os íons da camada *Stern* se movem juntamente com a partícula, enquanto os da camada difusa são divididos, movendo-se alguns juntamente e outros não. O potencial elétrico nesse plano de separação entre os íons que se movem juntamente e os que não, é chamado potencial zeta. Este potencial é um indicativo da estabilidade coloidal. (69)

As medidas de potencial zeta foram realizadas no Zetasizer Nano ZS-90 da Malvern. Variações potencial zeta em relação ao pH foram realizadas utilizando-se o MPT-2 Multi-Purpose Titrator, Malvern, acoplado ao Zetasizer Nano ZS-90.

3.1.6 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

Essa técnica combina o espalhamento de luz com a captura do movimento Browniano das partículas por uma câmera. A partir dos vídeos adquiridos o programa é capaz de calcular a concentração das partículas, o tamanho e os erros associados às medidas. (63-64)

Nesse projeto foi utilizado o equipamento NanoSight NS300 da Malvern. As medidas foram realizadas em triplicata com o procedimento padrão e vídeos de 30 s. Todas as amostras foram diluídas 1000 vezes para as medidas.

3.1.7 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica baseada na interação de uma ponteira presente no cantiléver com a superfície a ser medida, gerando mapas topográficos em 3D. Conforme o cantiléver se desloca pela superfície, são detectadas pequenas interações diferenciais, as quais provocam deflexão do cantiléver e são registradas pelo sistema do AFM. (72)

Neste trabalho foi utilizado o modo de não-contato, onde o cantiléver oscila acima da superfície de interesse. Para isso, o cantiléver TAP-190 foi escolhido, além da utilização do silício como substrato para a captura da imagem em um equipamento Nanosurf Flex-Axiom. O preparo da amostra se deu pela adição das nanopartículas na superfície do silício e posterior secagem com nitrogênio gasoso.

3.1.8 Microscopia confocal

O imageamento por microscopia confocal tem a vantagem de ser de observação remota, não destrutiva e em tempo real. Além disso, é possível remover a luz fora de foco da imagem coletada, portanto, esta possui uma resolução mais precisa e, como é possível a utilização de filtros para excitação e emissão, se mostrou a técnica mais adequada para análise da proteína verde fluorescente. (73)

O equipamento utilizado foi o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido).

3.2 DESENHO DO OLIGODEOXIRIBONUCLEOTÍDEO *ANTISENSE* (ASO)

Foi feito o desenho do ASO específico para a proteína verde fluorescente que possuía códons otimizados para expressão em mamíferos e cuja fluorescência seria analisada. Este desenho específico é de fundamental importância, já que ASOs apenas parcialmente complementares não geram resultados satisfatórios na inibição da tradução. Desta forma, quanto maior a eficiência do ASO desenhado, menor seria a fluorescência observada nas células.

A partir da sequência codificante, foi utilizado o *Basic Local Alignment Search Tool* (na função *blastx*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para identificar os aminoácidos. (67-68) A sequência codificante foi transformada em sequência de RNA, que no caso, é o RNA mensageiro utilizando um editor de sequência. (76) Vale ressaltar aqui, que a sequência codificante é a fita não molde para a transcrição e, portanto, suas bases não são complementares as do RNA mensageiro.

Para a predição da estrutura secundária do RNA mensageiro da GFP, foi utilizado o software *RNAstructure online* de livre acesso, desenvolvido pelo Grupo de Biologia do RNA (Mathews Lab) do departamento de bioquímica e biofísica da *University Rochester Medical Center*. (70-71)

Através desse programa é possível obter dados de probabilidade de interação entre as bases da sequência de RNA. Assim, é possível supor uma localização nessa estrutura secundária que seja mais desimpedida para a atuação do ASO.

Para avaliação das características do ASO escolhido, foi utilizada a extensão do *RNAstructure*, chamada *OligoWalk*, também desenvolvido pelo mesmo grupo e de livre acesso. (77) O *OligoWalk* utiliza como dado de entrada do *software* um arquivo gerado pelo *RNAstructure*. O usuário escolhe o comprimento do oligonucleotídeo a ser testado e a natureza, se será DNA ou RNA. Com isso, o programa calcula energias livres preditas entre o ASO e o RNAm, de associações intra e intermoleculares de ASOs, para a quebra da estrutura do RNAm e a temperatura de *melting*. Para tanto, o programa inicia com a primeira base do RNAm, até o comprimento desejado. Por exemplo, se deseja um ASO de 15 bases, o primeiro calculado será da 1ª a 15ª base, o segundo, da 2ª a 16ª e assim por diante, até chegar ao limite da sequência. Como o arquivo de saída apresenta inúmeras combinações, o programa mostra, quando solicitado, o mais estável. O

oligodeoxiribonucleotídeo escolhido foi adquirido da Sigma-Aldrich com purificação padrão e ressuspendido em tampão Tris-EDTA (10 mmol/L Tris e 0,1 mmol/L EDTA, pH 8) estéril, resultando em uma concentração de 100 μ mol/L. Volumes desta concentração foram adicionados as sínteses.

3.3 MODIFICAÇÕES DA QUITOSANA

A quitosana comercial de baixo peso molecular (LMW) foi adquirida da Sigma-Aldrich, sendo a precursora para as demais modificações. Seu peso molecular é na faixa de 50 a 190 kDa e o grau de desacetilação está entre 75 e 85%. As modificações foram realizadas para comparação tanto em relação a toxicidade gerada por suas nanopartículas quanto na eficiência de encapsulamento do ASO.

3.3.1 Despolimerização parcial da cadeia polimérica da quitosana

Inicialmente uma solução de 5,0 mg/mL de quitosana (LMW) em 1% ácido acético foi preparada e deixada *overnight* sob agitação magnética. No dia seguinte, foi adicionado através de gotejamento, 10 mL de solução de 1,0 mg/mL de NaNO_2 e a solução resultante foi deixada em agitação *overnight* novamente.

Após esse tempo a amostra foi nomeada apenas de quitosana despolimerizada (DSC), filtrada e armazenada a 4°C.

No caso da quitosana despolimerizada liofilizada (DLC), a solução foi colocada em uma membrana de diálise de 12 kDa contra água ultrapura durante 3 dias, sendo a água trocada todos os dias. Então, a amostra foi congelada e liofilizada para análises posteriores.

O tamanho da DLC foi obtido por cromatografia de exclusão de tamanho no Agilent 1100 séries utilizando colunas Shodex OHpak SB-803 HQ e SB-805 HQ. Além disso, outras técnicas de caracterização foram realizadas para a DLC e DSC, como FTIR e ^1H -NMR.

3.3.2 Quaternização dos grupo amino da quitosana

A quaternização dos grupos amino da quitosana se procedeu conforme o procedimento empregado por Curti et al. (79)

Para a trimetilação dos grupos amino da quitosana, transformando-a em uma amina quaternária, 1,0 g de quitosana foi colocada em 40 mL de 1-metil-2-pirrolidona (Sigma-Aldrich) com 5,5 mL de NaOH (15%), 2,4 g de iodeto de sódio e 5,7 mL de iodometano (Sigma-Aldrich) sob agitação magnética em capela de exaustão. A cada 3 horas foi adicionado 0,3 g de NaOH sólido e 1,0 mL de iodometano, durante às 12 primeiras horas. Após esse período, a reação foi deixada por outras 12 horas em agitação magnética, porém sem adição de reagentes. A solução foi, então, transferida para uma membrana de diálise de 12 kDa contra água ultrapura por 3 dias, depois em solução 0,1 mol/L NaCl por 2 dias e novamente mais 3 dias contra água. Finalmente, a amostra foi congelada e liofilizada.

A quitosana trimetilada (TMC) foi caracterizada por $^1\text{H-NMR}$, FTIR e o tamanho por cromatografia de exclusão de tamanho como descrito para a DLC.

3.3.3 Conjugação com polietilenoglicol

A conjugação da quitosana com polietilenoglicol (PEG) pode ser dividida em duas etapas: a primeira consiste na transformação do grupo álcool do PEG em carboxila, e a segunda na ligação dessa estrutura nos grupo amino da quitosana.

Primeiro foi feita uma oxidação de Jones baseada em Fishman et al., para tal, foi feita uma solução de 2,0 g de PEG₄₀₀₀ (Sigma-Aldrich) em 10 mL de solução ácida (2,7 mL de H₂SO₄ 96%). Essa solução foi adicionada a solução de 0,079 g de CrO₃ em 5,0 mL de H₂O. A reação foi mantida na capela de exaustão *overnight* sob agitação magnética. (80)

No dia seguinte, procedeu-se a extração: foram adicionados 25 mL de água e a solução foi extraída 3 vezes com diclorometano (50 mL). As frações orgânicas foram combinadas e lavadas com água destilada duas vezes (25 mL) e também duas vezes com 80 mL de uma solução saturada de NaCl (36 g de NaCl em 100 g de água). Novamente, combinou-se as frações orgânicas e estas foram secas com MgSO₄. Concentrou-se a amostra sob pressão reduzida. Com a adição de 80 mL de éter etílico, precipitou-se o PEG(COOH), o qual também foi colocado sob pressão

reduzida. Posteriormente, a amostra foi colocada em dessecador por mais 24 horas. (80) Tanto o PEG quanto o PEG(COOH) foram enviados para análise de $^1\text{H-NMR}$ e FTIR antes de prosseguir com a conjugação com a quitosana. Foi realizada uma titulação com NaOH para quantificação da modificação também.

A segunda etapa foi baseada em Casettari et al., foram preparados 50 mL de solução de 5,0 mg/mL de quitosana em 1% de ácido acético. Então, 0,2 g de PEG(COOH) foi adicionado e foi esperada sua completa solubilização para adição de 0,011 g de n-hidroxisuccinimida (NHS). Após 15 minutos, 0,2488 g de cloridrato de etilcarbodiimida (EDC) foram adicionadas e a reação foi mantida por 48 horas sob agitação magnética. Depois a amostra foi colocada em membrana de diálise de 12 kDa contra água e mantida durante 10 dias com troca diária da água. A amostra, C-PEG, foi liofilizada e caracterizada por $^1\text{H-NMR}$ e FTIR também.

3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

O método de gelatinização ionotrópica foi escolhido para a síntese das nanopartículas por ser um processo atóxico e livre de solventes orgânicos. Para tal, era feita uma solução ácida (1% de ácido acético) de quitosana (exceto a TMC que é solubilizada em água) na concentração de 5,0 mg/mL ou 4,2 mg/mL no caso DSC e uma de tripolifosfato de sódio (TPP) também de 5,0 mg/mL em água. As soluções eram duplamente filtradas com pressão reduzida em papel filtro qualitativo de gramatura 80 g da Unifil antes de serem armazenadas a 4°C. A síntese das nanopartículas era realizada através da adição lenta de TPP à solução de quitosana sob vigorosa agitação magnética, a qual permanecia durante 60 minutos. Após este tempo, era realizada a etapa de lavagem, onde as nanopartículas eram transferidas para tubo *falcon* de 15 mL e centrifugadas a 10.000 g, durante 40 minutos a 14°C. Depois da centrifugação, o sobrenadante era descartado ou armazenado para análises e o *pellet* era ressuspensionado em igual volume ao centrifugado.

Inicialmente, foram testadas as seguintes razões de quitosana/TPP: 3:1; 4:1; 5:1 e 6:1 para a LMW e DSC. A partir dos resultados de tamanho obtidos por DLS, foi escolhida a melhor proporção, da qual decorreram os experimentos subsequentes com todas as quitosanas.

As sínteses de nanopartículas com ASO foi realizada na melhor proporção definida, o DNA (10% do volume da síntese, ou seja, 100 μL em uma síntese de 1

mL) era adicionado à solução de quitosana sob agitação e após 2 minutos era adicionado o TPP e a reação era mantida em agitação por mais 60 minutos. O processo de lavagem ocorria como o descrito acima.

Com as Np sem ASO, foram realizadas medidas de DLS, potencial zeta, imagens de AFM, como forma de observar a morfologia das nanopartículas e a presença de agregados e foi feita a medida por NTA para estudo comparativo do tamanho em relação às técnicas utilizadas.

3.5 TESTES DE ESTABILIDADE

Para aferir a estabilidade das Nps em suspensão, foram realizados os testes descritos a seguir, com todas as Nps sem ASO, exceto quando mencionado.

3.5.1 Tamanho e potencial zeta em função do tempo

Depois de prontas e lavadas as soluções de Np eram armazenadas em geladeira e uma alíquota era retirada, diluída 10 vezes e eram realizadas as medidas de tamanho por DLS e carga por potencial zeta. Este experimento teve duração de 43 dias. Inicialmente foram feitas medidas em dias consecutivos e depois em dias alternados.

3.5.2 Tamanho e potencial zeta em função do pH

Para esse experimento foi utilizado o MPT-2 Multi-Purpose Titrator, também da Malvern, acoplado ao Zetasizer Nano ZS-90. Esse sistema consiste de um titulador com uma base com agitação magnética, ligado a uma cubeta de DLS específica ou de potencial zeta por duas mangueiras, uma de entrada e outra de saída, formando um sistema fechado. No recipiente onde é colocado o pHmetro, a solução de nanopartículas e as mangueiras de entrada e saída do Zetasizer, existem duas outras mangueiras associadas às soluções ácida ou básica, no caso, HCl 0,5 mol/L e NaOH 0,25 mol/L, as quais são responsáveis por adicionar as alíquotas determinadas e mudar o pH das Nps. Então a circulação é ligada e as medidas são realizadas no Zetasizer.

Esse experimento foi realizado em duas etapas: primeiramente foi analisado o tamanho ou potencial zeta do pH original de cada síntese até 1 e depois com outra solução, a mudança desses parâmetros com o pH crescente até 11.

3.5.3 Tamanho em função da temperatura

A técnica de DLS foi utilizada com a finalidade de estudar a estabilidade das Nps em diferentes temperaturas. É necessário saber essa informação, pois apesar, das sínteses normalmente ocorrem em temperatura ambiente, a possível aplicação dessas nanopartículas como nanocarreador seria em temperatura corpórea.

Para esse experimento, a temperatura inicial do equipamento foi selecionada como 22°C, aumentando a cada 10 minutos 1°C até atingir 45°C. A cubeta foi mantida dentro do equipamento durante todas as medidas.

3.5.4 Efeito de corona proteica

Para aferir a estabilidade dessas nanopartículas em meio de cultura, foram realizados estudos de formação de corona proteica ao redor das Np de quitosana. Inicialmente as nanopartículas eram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura Dulbecco Mem (DMEM) ou RPMI-1640 contendo 10% de FBS, seguida de 24 horas de incubação no Thermo-Shaker Agimaxx a 37°C e agitação de 300 rpm. No dia seguinte, as amostras eram novamente centrifugadas durante 40 minutos, 10.000 g, a 14°C. Finalmente, as amostras eram ressuspensas em água ultrapura e realizadas as medidas de potencial zeta.

Além disso, o teste do ácido bicinchônico (BCA) foi empregado na quantificação de proteínas totais adsorvidas na superfície das nanopartículas. Neste caso, o kit "*Bicinchonic Acid Protein Assay*" da Sigma-Aldrich foi utilizado. (81) Resumidamente, esse teste consiste na capacidade de alguns aminoácidos e de ligações peptídicas de reduzirem o Cu^{2+} para Cu^{1+} , o qual forma um complexo de coloração azul arroxeadado com o BCA que pode ser monitorada através da absorbância em 562 nm. Para esse ensaio foi construída uma curva de calibração utilizando albumina do soro bovino (BSA). O teste do BCA para as Np com ASO foi realizado apenas em meio de cultura RPMI-1640.

3.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A eficiência de encapsulamento dos ASOs foi quantificada com base nos procedimentos experimentais de Katas e Cheng. (82,83) Ambos se baseiam na absorbância do sobrenadante após a centrifugação, entretanto, Katas utiliza a absorbância do sobrenadante da nanopartícula sem o ativo como controle para normalização. Em contrapartida Cheng utilizou o sobrenadante das soluções centrifugadas a 25000 rpm, durante 60 minutos a 4°C para as medidas de absorbância, e a quantificação foi feita sem descontar nenhum controle. Para a quantificação, foi construída uma curva de calibração com concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 µmol/L de ASO.

Os valores de absorbância em 260 nm foram utilizados como absorção máxima para a construção da equação da reta na curva de calibração, para a quantificação do ASO encapsulado. A eficiência de encapsulamento foi calculada através da seguinte fórmula: $Eficiência (\%) = \frac{(ASO_{Total} - ASO_{Sobrenadante})}{ASO_{Total}} \cdot 100\%$

Para esse procedimento foi utilizada uma ultracentrífuga Optima Max- XP da Beckman Coulter. A quantificação de ASOs no sobrenadante foi feita para as nanopartículas com e sem ASO, sendo apresentados na forma de uma faixa de encapsulamento, ou seja, uma faixa entre o calculado como Katas e como Cheng. As Nps com e sem ASO também foram analisadas em relação ao tamanho pelo DLS e potencial zeta.

3.7 TESTES *in vitro*

Estes testes foram realizados como forma de comparação da toxicidade das nanopartículas das diferentes quitosanas em diferentes linhagens celulares. Além disso, o teste de inibição da fluorescência indica se o oligonucleotídeo encapsulado é liberado e se possui atividade. Sendo possível, dessa forma, avaliar quando o processamento da quitosana antes da síntese das nanopartículas é vantajoso.

A seguir são detalhadas todas as informações utilizadas para os testes *in vitro* realizados nessa dissertação, desde os materiais utilizados em cada teste até as linhagens celulares e suas concentrações.

3.7.1 Culturas celulares

Para os testes *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares: HepaRG (originária de carcinoma hepático, mas com características morfológicas e funções de hepatócitos humanos) (84) doadas gentilmente pela pesquisadora Dra. Natália Inada do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos; HTC (carcinoma hepático de *Rattus norvegicus*) e BHK-570 (célula de bebê de *hamster* deficiente em timidina quinase) ambas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro; e NB-4 (leucemia promielótica humana) que possui um plasmídeo para expressão constitutiva de uma GFP com códons otimizados para expressão em mamíferos, gentilmente doada pelo prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego do Hemocentro da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As linhagens HepaRG, HTC e BHK-570 foram cultivadas em meio Dulbecco Mem (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (FBS) e a linhagem NB-4 em meio RPMI-1640 com 10% de FBS, de acordo com as normas e recomendações da ATCC. As células foram crescidas em garrafas de 75 ou 175 cm², em estufa com atmosfera controlada em 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar. Os meios de cultura utilizados foram adquiridos da Vitrocell Embriolife, Campinas.

O método de azul de tripan foi utilizado para a determinação da viabilidade celular. Nesse método, o corante utilizado determina a integridade da membrana, já que as células vivas são impermeáveis, enquanto as mortas são permeáveis, obtendo, assim, uma coloração azulada. Deste modo, a contagem das células vivas e mortas se torna possível com a utilização da câmara de Neubauer. Somente culturas com viabilidade celular acima de 95% foram utilizadas.

3.7.2 Preparo de amostras para ensaios celulares

As nanopartículas foram obtidas a partir das sínteses descritas na seção “Síntese das Nanopartículas”. As sínteses com ASO foram realizadas utilizando 100 µL de solução 100 µmol/L em sínteses de 1,0 mL. Depois de pronta, as nanopartículas eram transferidas para um tubo *falcon* estéril e se prosseguia o processo de lavagem, como descrito anteriormente. Após a centrifugação, o *pellet* era ressuspensionado em meio de cultura adequado para a realização dos

experimentos *in vitro*. A diluição inicial foi estabelecida como 1:5, isso é 1,0 mL de síntese inicial foi ressuspensionado em 5,0 mL de meio de cultura, e a partir dessa solução eram realizadas outras diluições: 1:10; 1:50 e 1:100. As diluições citadas foram utilizadas para o tratamento das linhagens aderentes. Para a linhagem não aderente (NB-4), houve uma segunda diluição das nanopartículas de 1:2, pois é acrescentado ao volume de células plaqueadas um volume igual de nanopartículas. Portanto, nessa linhagem, a indicação de 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100 se refere a diluição inicial dos nanomateriais.

3.7.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular escolhido foi o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), por ser o predominante em testes de citotoxicidade com quitosana e nanopartículas de quitosana, sendo assim, há mais embasamento para posterior discussão dos resultados. Esse método se baseia no metabolismo mitocondrial, onde uma redução da atividade metabólica pode ser considerada como um indicador inicial de lesão celular. Neste teste, as mitocôndrias convertem o sal de tetrazolium, amarelo, em cristais de formazan azuis e insolúveis, os quais são posteriormente solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) ou isopropanol ácido (0,04 mol/L HCl em isopropanol absoluto) e, cuja absorbância em 570 nm é medida e relacionada com a viabilidade. (85)

Para os testes de MTT das linhagens HepaRG, HTC e BHK-570, 100 µL de 1×10^5 células/mL eram adicionados à placas de 96 poços utilizando meio DMEM sem fenol com 10% de FBS. Após 24 horas, esse meio era retirado e 100 µL de Nps ou meio de cultura (controle) eram adicionados e a placa, incubada por mais 24 ou 48 horas. Após o tempo de incubação, o meio era removido e 100 µL da solução de MTT (1,0 mL de MTT 5,0 mg/mL em PBS + 9,0 mL de DMEM 10% FBS) adicionados aos poços e a placa era incubada por mais 4 horas. Depois desse período, a solução era removida e 100 µL de DMSO adicionados para dissolver o formazan, e a placa deixada em agitação orbital por 20 minutos e protegida da luz. As medidas da absorbância em 570 e 630 nm eram realizadas em seguida, sendo o segundo comprimento de onda utilizado para redução do sinal de fundo.

No caso da NB-4, por se tratar de uma linhagem não aderente, algumas modificações no protocolo foram necessárias. Inicialmente, 50 µL de 2×10^5 foram

adicionados aos poços da placa utilizando-se meio RPMI-1640 sem fenol com 10% de FBS. Após 6 horas, 50 µL de Nps ou meio de cultura (controle) eram adicionados e a placa incubada por mais 18 ou 42 horas. Depois, 10 µL da solução de MTT (5,0 mg/mL em PBS) era diretamente adicionado aos poços (sem diluição no meio como para as linhagens aderentes) e a placa era incubada por mais 4 horas. Então, 100 µL de isopropanol ácido eram adicionados em cada poço, seguido de agitação por 20 minutos, protegida da luz. As leituras de absorbância eram realizadas em 570 e 630 nm.

A comparação entre os tratamentos foi realizada através do teste T de Student com um nível de significância de 5%.

3.7.4 Análise de fluorescência por microscopia confocal

As imagens de fluorescência foram realizadas apenas para a linhagem NB-4, visto que é a única que expressa a GFP. As células foram excitadas em um comprimento de onda de 488 nm e a emissão foi adquirida com um filtro de 493 a 598 nm. Para isso, 0,5 mL de células com uma concentração de 2×10^5 células/mL em meio RPMI-1640 sem fenol e 10% de FBS foi plaqueado em placas de petri com lamínula de vidro de 35 x 10 mm específicas para microscopia confocal (SPL Life Sciences). Após 6 horas foi adicionado 0,5 mL de Nps, meio de cultura (controle negativo) ou meio de cultura com 10 µL de ASO (controle positivo). As placas foram incubadas por 18 horas para então serem realizadas as imagens no microscópio confocal. Depois, as células foram incubadas novamente por mais 24 horas, para serem feitas as imagens de 42 horas das mesmas placas.

As Np utilizadas para esse experimento foram LMW, DSC, DLC e C-PEG na diluição de 1:50, com e sem DNA. As Nps TMC com e sem ASO tiveram uma diluição maior, 1:100, devido aos resultados obtidos nos testes de toxicidade.

As imagens foram processadas no programa de livre acesso ImageJ. Foram selecionadas pelo menos 150 células, quando possível, de cada tratamento para realização de comparação estatística de fluorescência. Para a quantificação da intensidade de fluorescência, inicialmente as células foram circundadas uma a uma, e então, a média de fluorescência foi calculada. Para a correção de fundo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Fluorescência} = \text{densidade integrada} - (\text{área da célula} \times \text{média de fundo})$$

Essa metodologia para quantificação da fluorescência foi utilizada por McCloy et al. (86)

3.8 RESUMO GRÁFICO

Para facilitar o entendimento e aplicação das técnicas de maneira cronológica, um resumo esquemático do fluxo de trabalho realizado é apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática do fluxo de trabalho.
Fonte: Elaborada pela autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENHO DO OLIGODEOXIRIBONUCLEOTÍDEO *ANTISENSE* (ASO)

O RNA mensageiro é o responsável por transmitir a informação do núcleo ou, no caso, do plasmídeo, para os ribossomos e, assim, provocar a síntese proteica. Sabendo-se que o código genético é degenerado, ou seja, há mais de um códon para cada aminoácido, existem códons preferenciais de cada espécie. Nessa dissertação a GFP possuía códons otimizados para expressão em mamíferos. Quando utilizamos a sequência de bases no BLAST que compara com um banco de dados de sequências codificantes, não é obtido nenhum resultado com 100% de homologia. Entretanto, se utilizarmos o blastx, que transforma a sequência em aminoácidos e compara com o banco de proteínas, é obtida uma identidade de 100% com uma GFP. Sendo assim, apesar de os aminoácidos resultantes serem os mesmos de outras GFPs, o que interessa neste momento é a sequência de bases e, portanto, não seria qualquer sequência *antisense* para GFP que induziria uma diminuição da expressão. Portanto, nessa dissertação foi feito o desenho do ASO a ser encapsulado.

Inicialmente foi utilizado o programa RNAstructure para a predição da estrutura secundária do RNA mensageiro da GFP. (87) O programa retornou as 20 estruturas termodinamicamente mais prováveis, destas, a primeira está apresentada na **Figura 7** e outras quatro estão no Anexo A. Observando as 5 estruturas expostas nesse trabalho, observa-se que há grande variabilidade nas conformações e regiões, que ora aparecem desimpedidas ora pareadas.

Todavia, foi possível encontrar um *loop* que apareceu em todas as estruturas preditas e com várias bases com alta probabilidade de estarem nessa conformação (essa estrutura está destacada na **Figura 7**), ou seja, estariam livres para associação com o ASO. Isto é importante, pois já foi descrito na literatura que ASOs desenhados para alvos altamente estruturados não diminuiriam a expressão de proteína repórter. (11)

Figura 7 – Estrutura do RNA mensageiro da GFP de menor energia livre gerado pelo programa RNAstructure com indicação da localização do ASO.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Na **Figura 7** está destacado o *loop* e a posição do ASO. É importante lembrar que a sequência do ASO possui bases complementares as da figura, e por se tratar de uma fita de DNA, possui timina e não uracila. A sequência do ASO de 20 bases seria então 5'-GTGCTCTTCATCTTGTTGGT-3'.

Entretanto, existem alguns outros fatores que podem afetar a associação do ASO ao RNA mensageiro, como a estabilidade desse *duplex*, ou a própria estrutura do ASO, caso ele forme uma estrutura própria intra ou intermolecular. (81-82) Nessa dissertação foi utilizado o programa OligoWalk no modo de “*Break local structure*” para aquisição dos parâmetros a serem comparados. A afinidade do oligonucleotídeo com sua sequência complementar no RNA mensageiro é expressa como uma medida da variação da energia livre de Gibb's das estruturas separas, e delas formando o complexo (ΔG^0). Estes dados são calculados considerando-se a temperatura de 37°C.

De acordo com o estudo realizado por Mathews et al., comparando os dados obtidos pelo OligoWalk com os dados de um ensaio de clivagem pela RNase-H para determinação das regiões do RNA acessíveis a clivagem, foi observado que os menores valores de $\Delta G^0_{\text{overall}}$ representam uma maior porcentagem de indução à clivagem. Além disso, para análise da eficiência *antisense* foi observada uma correlação com a estabilidade do *duplex*, $\Delta G^0_{\text{duplex}}$. (88) A diferença básica do $\Delta G^0_{\text{overall}}$ com $\Delta G^0_{\text{duplex}}$ é que o primeiro considera as estruturas, enquanto o segundo refere-se aos dados da associação não estruturada. Na Tabela 1, são apresentados os dados para o ASO considerado, pela análise visual das imagens geradas pelo RNAstructure, como melhor (103), para três outros que deslocam apenas alguns pares de bases (100, 101 e 102), porém continuam no mesmo *loop* e para o predito mais estável (530).

Tabela 1 – Relação das energias livres dos ASOs presentes no *loop* (100, 101, 102 e 103) e do predito mais estável (530). $\Delta G^0_{\text{overall}}$ é a energia livre sem considerar a estrutura e $\Delta G^0_{\text{duplex}}$ é a energia livre considerando a estrutura do RNA mensageiro.

Posição da base de início	$\Delta G^0_{\text{overall}}$ (kcal/mol)	$\Delta G^0_{\text{duplex}}$ (kcal/mol)
100	-23,2	-23,6
101	-25,0	-25,4
102	-24,3	-24,7
103	-25,1	-25,5
530	-27,8	-31,1

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos dados apresentados na Tabela 1 e do discutido acima, apesar do ASO 530 apresentar um $\Delta G^0_{\text{duplex}}$ consideravelmente menor, o $\Delta G^0_{\text{overall}}$ não apresenta tanta diferença do ASO 103. Como o ASO 103 se complexa em uma região que apresenta a mesma conformação em todas as predições estruturais do mRNA e por ser uma região mais desimpedida suas energias livres não variam muito, portanto esse foi o ASO escolhido para esse trabalho. Além disso, o $\Delta G^0_{\text{intra}}$ de interação intramolecular é 0 kcal/mol e o $\Delta G^0_{\text{inter}}$ de interação intermolecular é -3 kcal/mol, sendo, respectivamente, maiores que -1,1 e -8 kcal/mol o que aumentam a proporção de oligonucleotídeos ativos. (89)

Nesse momento, torna-se interessante mencionar que o programa RNAstructure sofreu atualizações durante a escrita desta dissertação (da versão disponível em 2015 para a versão disponível em 2018), tornando-se mais preciso na predição estrutural de sequências maiores. Com isso, a estrutura mais provável do mRNA predita anteriormente mudou. Entretanto, o *loop* utilizado para o desenho do ASO continuou presente em todas as novas estruturas preditas. Além disso, devido a essas mudanças, quando utilizado o OligoWalk novamente, ele alterou a estrutura mais estável de oligodeoxiribonucleotídeo *antisense* daquela de posição 530 predita anteriormente para a de 103, que é exatamente a escolhida e utilizada nesse trabalho. Como o $\Delta G^0_{\text{duplex}}$ não leva em consideração a estrutura, somente as bases e suas interações, ele não sofreu alteração, entretanto o $\Delta G^0_{\text{overall}}$ da 530 passou a apresentar um valor de -5,6 kcal/mol.

A sequência 5'-GTGCTCTTCATCTTGTTGGT-3' desenhada foi comprada da Sigma-Aldrich com purificação padrão. Esse produto foi entregue liofilizado, sendo então ressuspendido em tampão Tris-EDTA para uma concentração final de 100 $\mu\text{mol/L}$ e armazenado a -20°C .

4.2 MODIFICAÇÕES DA QUITOSANA

4.2.1 Despolimerização parcial da cadeia polimérica da quitosana

A despolimerização da quitosana com NaNO_2 foi patenteada em 1975, mostrando seu interesse comercial desde aquela época. Isso se deve às possíveis alterações em suas propriedades, como diminuir a viscosidade, aumentar a solubilidade em pH menos ácido, aumentando assim suas aplicações. (90) A reação de despolimerização é uma das modificações mais utilizadas na cadeia polimérica da quitosana, e foi realizada nessa dissertação com base em protocolos da literatura, porém com algumas modificações. (49,91) Como inicialmente não se sabia a massa molar da LMW, utilizou-se uma razão entre a quitosana e o NaNO_2 , considerando a menor e a maior massa molar do intervalo fornecido pelo fabricante e desconsiderando o grau de acetilação. Obtendo as relações molares de 0,035 e 0,009 de quitosana e NaNO_2 , respectivamente.

A despolimerização acontece nas unidades de N-glucosamina da quitosana, pois o NaNO_2 em meio ácido se dissocia dando origem ao ácido nitroso, o qual

reage com a amina primária da quitosana quebrando a ligação glicosídica entre os monômeros, com consequente desaminação e evolução de nitrogênio. (90) Essa é uma reação estequiométrica na qual 1,0 mol de NaNO_2 reage com 1,0 mol de monômeros de N-glucosamina originando 1,0 mol de açúcar redutor (possui um grupo hemiacetal no carbono 1). Esse açúcar redutor pode ser quantificado, por exemplo, pelo método colorimétrico de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). (51,92)

Apesar de Mao et al. terem observado que a concentração inicial da solução de quitosana influencia na despolimerização, nesse experimento foi mantida a concentração de 5,0 mg/mL de quitosana, caso contrário, a síntese das Nps com DSC não seguiria os mesmos padrões de concentração final daquelas feitas com as outras quitosanas. (91)

Após a reação de degradação com NaNO_2 houve uma mudança na viscosidade da solução de quitosana. A solução foi dialisada, congelada, liofilizada e chamada de DLC como descrito na metodologia. Os resultados da cromatografia de exclusão de tamanho em tampão acetato (ácido acético 0,3 mol/L e acetato de sódio 0,2 mol/L com pH ajustado para 4,5) mostraram que a LMW apresentou um tamanho de 184,30 kDa e um índice de polidispersividade de 1,39, o que é condizente com as informações do fabricante, que declara ser um produto de massa molar média de até 190 kDa. A DLC apresentou tamanho de 16,85 kDa e polidispersividade de 2,11. Com isso, é possível observar que a despolimerização parcial da cadeia de quitosana foi eficiente, reduzindo em mais de 10 vezes seu tamanho. Além disso, o fato do índice de polidispersividade ter aumentado era esperado, visto que a degradação não ocorre de forma igualitária entre todas as cadeias e/ou moléculas.

O espectro de transmitância apresentado na **Figura 8** não apresenta mudanças nos grupos funcionais na cadeia polimérica, apesar de seu encurtamento com a despolimerização. Esse resultado também foi obtido por Mao et al. com quitosanas de 5 a 400 kDa. (91)

Figura 8 – Espectro de transmissão no infravermelho de LMW (azul), DSC (vermelho) e DLC (verde).
Fonte: Elaborada pela autora.

As bandas mais características da quitosana, O-H e NH₂, estão presentes entre 3000 e 3500 cm⁻¹; o estiramento assimétrico de C-C-O, em 1150 cm⁻¹; estiramento de C-H, em 2870 cm⁻¹; deformação angular de N-H de amina primária, em 1560 cm⁻¹ e o estiramento de C-O-H estão de acordo com a literatura. (51-52,86)

Os resultados dos espectros de ¹H-NMR apresentam resquícios de ácido acético e impurezas para a DSC, provavelmente por essa não ter passado pelo processo de diálise, diferentemente do observado para a DLC que não apresentou esses picos (Figura 10 e Figura 11, respectivamente). Também é possível observar diferenças quando as quitosanas despolimerizadas são comparadas com a LMW (Figura 9), como a presença do açúcar redutor nas extremidades de N-glucosamina que sofreram despolimerização.

Figura 9 – Espectro de ^1H -NMR da LMW.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 – Espectro de ^1H -NMR da DSC.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 – Espectro de $^1\text{H-NMR}$ da DLC.
Fonte: Elaborada pela autora.

Com a integração dos picos H2 da glucosamina em 3,56 ppm e dos H da porção D (presente apenas nos resíduos que reagiram com HNO_3) em 3,93, com posterior normalização, calcula-se 54% de despolimerização das glucosaminas.

4.2.2 Quaternização dos grupo amino da quitosana

A trimetilação dos grupos amino da quitosana, transformando-a em uma amina quaternária foi feita visando o aumento da solubilidade desse polímero em água (pH acima de 6,5), visto que essa é uma característica limitante para sua aplicação em sistemas biológicos. (79) A principal característica da quitosana trimetilada é a sua carga positiva permanente. O que aumenta sua solubilidade, mas, por outro lado, pode aumentar a citotoxicidade associada. Após a reação de quaternização, a TMC liofilizada foi ressuspensa em água ultrapura e filtrada como descrito na metodologia. A TMC se mostrou solúvel em água na concentração de 5,0 mg/mL sem adição de ácidos. Durante a reação de trimetilação, também pode ocorrer despolimerização parcial da cadeia e, de fato, por análise de cromatografia por exclusão de tamanho, foi obtido um peso molar de 164,7 kDa, um pouco inferior ao da LMW (184,3 kDa) e seu índice de polidispersividade também aumentou, 4,21,

assim como para a DLC, o aumento do índice de polidispersividade pode estar relacionado a reação não ocorrer igualmente em todas as moléculas e até mesmo ao padrão inicial de acetilação. Já é descrito na literatura uma diminuição de tamanho durante este processo. (94)

Apesar do espectro de FTIR não permitir a quantificação da modificação das aminas, é muito útil nas análises qualitativas para avaliar mudanças estruturais.

Figura 12 – Espectro de transmissão no infravermelho de LMW (azul) e TMC (roxo).
Fonte: Elaborada pela autora.

No espectro da **Figura 12**, é possível observar uma banda em 1475 cm^{-1} (indicada por uma linha pontilhada) apenas na TMC, essa banda é referente ao estiramento assimétrico da ligação C-H nos grupos metil. Além disso, a banda referente à deformação angular da ligação N-H nos grupos amino ($1560\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) é reduzida, sendo sobreposta pela banda de estiramento do carbonil da acetamida ($1630\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$), que é atribuída aos sais de amônia quaternária, a região de 1560 a 1690 cm^{-1} está demarcada no espectro. (49,87-88)

Para quantificação da modificação, recorreu-se a $^1\text{H-NMR}$, cujo espectro está apresentado na **Figura 13**.

Figura 13 – Espectro de ^1H -NMR da TMC.
Fonte: Elaborada pela autora.

A quantificação dos grupamentos di e trimetilados foi realizada como por Mourya e Inamdar. (95) Foram feitas as integrações dos picos H1 referente a glucosamina (entre 5,0 e 5,4 ppm), dos H referentes a dimetilação (3,45 ppm) e trimetilação (3,71 ppm). Com isso, foi determinado 42% de dimetilação e 50% de trimetilação.

4.2.3 Conjugação com polietilenoglicol

A conjugação com PEG é associada a um aumento da circulação da Np administradas por via parenteral, pois a presença do PEG evita sua captura pelo sistema retículoendotelial (também conhecido como sistema mononuclear fagocitário) visto que dificulta a opsonização. (30) Ademais, a conjugação com PEG pode aumentar a solubilidade da quitosana em valores de pH mais altos. (89-90)

A primeira etapa da conjugação com PEG consistiu na transformação de seu grupo álcool para carboxila, pois assim, através de EDC/NHS seria possível promover a ligação da carboxila do PEG à amina da quitosana. Tanto o PEG quanto o PEG-COOH foram caracterizados através de FTIR (Figura 14) e ^1H -NMR (Figura 15).

Figura 14 – Espectro de transmissão no infravermelho do PEG (preto) e PEG-COOH (laranja).
Fonte: Elaborada pela autora.

A **Figura 14** apresenta o espectro de transmissão no infravermelho do PEG e do PEG-COOH. A banda em 3456 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações O-H; 2950 e 2875 cm^{-1} , são devidas ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H; entre 1341 e 1463 cm^{-1} , ocorrem os dobramentos angulares de C-H; 1234 cm^{-1} relaciona-se ao estiramento assimétrico de C-O-O; 1147 cm^{-1} está relacionada ao estiramento simétrico da ligação C-O-C de grupos éter; 1112 cm^{-1} , é o estiramento de C-O do grupamento álcool; 1060 cm^{-1} refere-se a deformação axial de CO-C; 940 cm^{-1} , o dobramento de $=\text{C-H}$; 840 cm^{-1} , deformação de vibração alifática C-CH; 530 cm^{-1} vibração C-C e, por fim, a banda em 1720 cm^{-1} na amostra de PEG-COOH está relacionada ao estiramento de ácidos carboxílicos saturados (indicada por uma linha tracejada no espectro). (96,98) Assim, é possível inferir que ocorreu a modificação do grupo álcool do PEG para carboxila. Com a técnica de $^1\text{H-NMR}$ (**Figura 15**) foi possível a quantificação da modificação.

Figura 15 – Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (1) PEG, (2) PEG-COOH.
Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a **Figura 15**, o pico em 4,66 ppm em (1) e (2) é relacionado à D_2O ; para o PEG (1), observa-se um sinal em 3,59 ppm que corresponde aos hidrogênios do grupo CH_2 de toda a cadeia polimérica. Para o PEG-COOH (2), um novo pico em 4,06 ppm é observado além dos outros dois, sendo esse relacionado aos hidrogênios do grupo CH_2 vizinhos aos ácidos carboxílicos. Pela integração dos picos é possível calcular uma modificação estrutural de 37%, resultado que condiz com o obtido na titulação ácido-base do composto modificado.

O próximo passo foi a conjugação da quitosana com o PEG-COOH. Esse processo deve ocorrer de forma parcial, visto que poderia afetar a densidade de carga da quitosana, e com isso, prejudicar suas propriedades caso uma intensa modificação ocorresse. (97) A **Figura 16** apresenta o espectro de transmissão no infravermelho da LMW e da quitosana modificada com PEG (C-PEG).

Figura 16 – Espectro de transmissão no infravermelho da LMW (azul) e C-PEG (laranja).
Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a **Figura 16** é possível observar picos em 840, 946 e 2922 cm^{-1} referentes à estrutura do PEG-COOH (indicados com linhas tracejadas) mostrando que a modificação de grupamentos amino ocorreu com sucesso. (97,99) Para a quantificação da modificação foi utilizada a técnica de 1H -NMR. A **Figura 17** apresenta o espectro 1H -NMR da C-PEG.

Figura 17 – Espectro de ^1H -NMR da C-PEG.
Fonte: Elaborada pela autora.

Através da integração dos picos da quitosana H1(GlcN) em 5,17 ppm ou do H2(GlcN) em 3,63 ppm e do PEG(-O-CH₃) em 3,44 ppm, encontra-se uma modificação de 5% dos grupamentos amino após a normalização em relação à LMW. Esse valor é próximo ao encontrado por Casettari et al. que obtiveram modificações entre 1,5 e 6,7% dos grupamentos amino, variando de acordo com a massa do PEG e da quitosana utilizados. (97)

4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das Np ocorre pela interação do poliânion tripolifosfato de sódio (TPP) com a quitosana, que em pH ácido possui seus grupamentos amino carregados positivamente, proporcionando assim condições para interação eletrostática. Esta é uma síntese que não utiliza solventes orgânicos ou tóxicos, é rápida, de baixo custo e sabendo-se da natureza negativa do ASO, ela se mostrou adequada ao propósito dessa dissertação. As nanopartículas de quitosana foram formadas com adição do TPP em algumas proporções, como proposto por Calvo et al. Para isso, foram utilizadas duas concentrações de quitosana (2,0 e 3,0 mg/mL) e

4 relações com TPP: 6:1, 5:1, 4:1 e 3:1. (100) Outro parâmetro que pode influenciar o tamanho das Nps é o modo de adição do TPP. Nessa dissertação foi escolhido o método de gotejamento pois, esse método, na ausência de outros sais e portanto com menor intensidade iônica no meio, é capaz de gerar nanopartículas ligeiramente menores do que a adição rápida. (7) Esse estudo de formulação foi realizado para a Np LMW e Np DSC. (Figura 18).

Figura 18 – Tamanho das Nps de LMW (1) e DSC (2) com diferentes concentrações e razões com TPP.

Fonte: Elaborada pela autora.

As Nps com menores concentrações de quitosana apresentaram um tamanho menor, tanto para a LMW quanto para a DSC. (102) Para 2,0 mg/mL de LMW, a relação de 4:1 foi a que apresentou menor tamanho, 421 nm e um potencial zeta de +47 mV, indicando alta estabilidade em meio aquoso. Para as Np DSC, 2,0 mg/mL também foi a melhor concentração. Apesar da relação 6:1 de quitosana para TPP apresentar o menor tamanho para essa Np, optou-se em seguir os demais estudos com a síntese de relação 4:1. Esta escolha foi feita para que fosse mantida a mesma formulação entre todas as quitosanas utilizadas em estudos posteriores de estabilidade e citotoxicidade. Luque-Alcaraz et al. também observaram a relação concentração-tamanho dependente para nanopartículas de quitosana feitas por nanoprecipitação. (24) Vila et al. obtiveram tamanhos entre 300 e 400 nm para as Nps com relação 6:1 de quitosana e TPP, porém nesse estudo foram utilizadas quitosanas maiores que 50 kDa e a concentração final do polímero foi menor do que 2,0 mg/mL. (34)

Além disso, assim como observado por Janes e Alonso, as Nps provenientes de quitosana despolimerizada propostas nessa dissertação, apresentam um tamanho menor do que aquelas da sua precursora. (30,49)

4.4 TESTES DE ESTABILIDADE

Para os testes de estabilidades foram monitorados tamanho e potencial zeta em função do tempo e pH, e tamanho em função da temperatura. Nas próximas seções serão apresentados os gráficos com todas as 5 nanopartículas diferentes compiladas em uma figura. Gráficos individuais para cada quitosana (exceto de tamanho e potencial zeta em relação ao tempo) estão disponíveis nos anexos indicados.

4.4.1 Tamanho e potencial zeta em função do tempo

A **Figura 19** mostra o gráfico de tamanho em função do tempo para as nanopartículas. Observa-se uma pequena alteração de tamanho nos primeiros 10 dias para todas as Nps, sendo maior para a Np TMC. Apesar das nanopartículas de DSC, DLC e C-PEG iniciarem com tamanhos um pouco diferentes, 206 ± 3 , 175 ± 3 e 245 ± 3 nm, respectivamente, elas convergem para tamanhos próximos. O mesmo fenômeno pode ser observado entre a Np LMW e a Np TMC, sendo que a primeira manteve-se mais estável, variando de 474 ± 4 nm no 1º, para 493 ± 19 nm no 43º dia. Enquanto a segunda apresentou um aumento significativo de tamanho, passando de 323 ± 2 nm no 1º, para 475 ± 21 no 43º dia.

Figura 19 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x tempo).

Fonte: Elaborada pela autora.

Percebe-se novamente a influência do peso molecular da quitosana no tamanho final das nanopartículas quando as Nps DSC e a DLC são comparadas com a LMW, onde as Np DSC e DLC são cerca de 2 vezes menores que a Np LMW. O mesmo comportamento foi observado por Janes e Alonso com outras relações de quitosana/TPP. (49)

Amidi et al. reportaram Nps TMC sintetizadas pelo método de gelatinização ionotrópica com TPP, na relação 5,5:1 com um tamanho de 360 ± 26 nm. Esses dados corroboram com os resultados apresentados nessa dissertação, os quais indicam que no dia da síntese os tamanhos das Nps apresentaram tamanho de 323 ± 2 , porém aumentaram ao longo dos dias até atingir um platô. O valor do índice de polidispersividade (Pdl) médio para essas nanopartículas foi de 0,169, abaixo do valor apresentado por Amidi et al. (103)

Fan et al. avaliaram a estabilidade das Nps de quitosana armazenadas a temperatura ambiente durante 20 dias, os estudos indicaram que as Nps não apresentaram mudanças significativas no tamanho, continuando em suspensão após esse período. (102) Considerando um nível de significância de 5%, nos dados apresentados na Figura 19 para o teste T de Student, apenas as Nps DLC e a TMC apresentam diferenças significativas entre o primeiro e o último dia, o que indica

uma boa estabilidade no período estudado. As suspensões continuaram estáveis até o 43º dia, corroborando com o exposto por Fan et al. Contudo, a alteração em nanômetros da Np DLC foi de apenas 25 nm enquanto a Np TMC aumentou em 170 nm.

A variação dos valores de potencial zeta também foi avaliada no mesmo período de tempo que o tamanho, os dados podem ser observados na **Figura 20**. Os valores de potencial zeta das Nps LMW e TMC aumentaram do primeiro para o segundo dia e depois diminuíram, enquanto as demais nanopartículas pareceram manter uma estabilidade maior durante o período analisado.

Figura 20 – Estabilidade das nanopartículas (potencial zeta x tempo).
Fonte: Elaborada pela autora

Jonassen et al. também perceberam uma ligeira queda no potencial zeta de Nps de quitosana com TPP em um mês, porém apenas as medidas do primeiro e do trigésimo dia foram apresentadas, não sendo possível saber se ocorreram flutuações ao longo desse período. (104)

O potencial zeta da Np TMC apresentou um valor menor do que o das outras sínteses, iniciando em 28 ± 1 mV, porém houve um aumento seguido de um decaimento nos valores. Todavia, esse valor de potencial zeta é maior do que o encontrado por Amidi et al., de 20 mV. (103) O menor valor de potencial zeta em

relação às outras sínteses pode ser devido à mudança de meio reacional, isso é, a TMC é ressuspendida em água ao invés de uma solução de ácido acético 1%. Nesse caso, os grupamentos amino que não foram trimetilados não estavam carregados positivamente. A Np LMW, muito provavelmente, apresenta um potencial zeta maior devido à presença de mais grupos amino já que não foram inseridas modificações na sua cadeia polimérica. Sendo assim, com as mesmas concentrações de TPP, ocorre uma menor redução da carga positiva.

4.4.2 Tamanho e potencial zeta em função do pH

Sabendo que a via de administração oral é a mais fácil e conveniente para os pacientes, foi realizado um estudo de estabilidade das Nps em relação ao pH. Além disso, a característica de mucoadesão da quitosana pode ajudar a aumentar a absorção das drogas a serem administradas desta forma.

A quitosana comum possui um pK_a de aproximadamente 6,5, ou seja, a partir desse valor, seus grupamentos amino passam a estar em sua maioria desprotonados. Com isso, pode-se prever que ocorrerá uma diminuição do potencial zeta e, conseqüentemente, um aumento no tamanho devido à agregação.

Figura 21 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x pH).

Fonte: Elaborada pela autora.

Um fato interessante que pode ser observado na **Figura 21** ou no Anexo B, é que para as Nps LMW, TMC e C-PEG, é possível perceber uma diminuição do tamanho das nanopartículas em torno do pH 6. Esse comportamento pode ocorrer, devido ao fato de nesse pH alguns grupos amino tornarem-se desprotonados, o que diminui a interação com o TPP. Ali et al. realizaram um estudo alterando o pH da síntese das Nps de quitosana e também observaram essa queda no tamanho no pH 6,0, com intenso aumento após a elevação do pH para 6,5. (56)

Através da **Figura 22** e do Anexo C, verifica-se que, exceto para a Np TMC, todas as Nps atingem seu ponto isoelétrico, ponto no qual a carga elétrica líquida é zero, entre os valores de pH 8,6 e 9,3. Neste mesmo intervalo de pH ocorreu um aumento do tamanho dessas nanopartículas muito provavelmente devido à agregação, proveniente da desestabilização das cargas.

Figura 22 – Estabilidade das nanopartículas (potencial zeta x pH).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nallamuthu et al. fizeram a titulação das nanopartículas de quitosana, do pH 4 ao 10, e encontraram o ponto isoelétrico em 7,66. Essa diferença pode ser devido ao potencial zeta inicial, que para eles foi +30 mV, indicando que havia menos carga nas suas Nps. Porém o mesmo perfil de curva de queda do pH foi encontrado. (57)

4.4.3 Tamanho em função da temperatura

O tamanho de uma nanopartícula pode ser alterado com o a mudança da temperatura. Conhecer este comportamento é importante, principalmente se uma aplicação biológica é desejada. Para as medidas de tamanho em função da temperatura, o equipamento foi ajustado para que a cada 1°C aumentado, fosse feita uma pausa de 10 minutos antes da medida de DLS. Essas medidas foram realizadas de 22 a 45°C, com variação de 1°C entre cada. Os gráficos de cada Np individualmente estão no Anexo D.

Figura 23 – Estabilidade das nanopartículas (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.

Através da **Figura 23** é possível observar uma leve redução do tamanho das Nps de todas as quitosanas, sendo mais aparente para a Np LMW, que chegou a apresentar uma variação de mais de 100 nm. Apesar das temperaturas utilizadas por Nallamuthu et al. terem sido bem maiores do que as aqui empregadas, ele obteve uma redução do tamanho, tanto durante o tempo analisado (15 minutos) quanto nas temperaturas, sendo a redução do tamanho das Nps em 80°C menor do que em 100°C e essas duas menores do que aquelas em 120°C. Ele deduz que o aquecimento deva interferir na adsorção do ácido clorogênico, bem como na

estrutura de *cross-linking*. (57) Utilizando o teste T de Student para comparar o tamanho das nanopartículas em 22°C e 45°C, apenas a Np TMC não apresenta diferenças significativas de tamanho. Como o pH e o pK_a sofrem alterações diferentes com a mudança de temperatura, este novo equilíbrio pode ter induzido uma desprotonação de alguns grupamento amino levando à uma menor interação com o TPP e, conseqüentemente, uma leve redução do tamanho. (105) Esse fenômeno também é observado na **Figura 21** em torno do pH 6. Além disso, a ausência dessa diferença na Np TMC corrobora com os resultados já apresentados que a alteração do pH não induz uma alteração do tamanho dessas nanopartículas. Portanto aqui, pode-se sugerir que a mudança de temperatura influencia sutilmente no tamanho devido à mudança no pH e pK_a .

4.4.4 Análise de tamanho por NTA

A técnica de NTA foi utilizada para comparar o tamanho das nanopartículas medidas por essa técnica e pela técnica de DLS. Além disso, pelo NTA foram medidas as concentrações das partículas, esses valores estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Dados comparativos de medidas de tamanho aferidos por duas técnicas: NTA e DLS.

Amostra	Média	Moda	Concentração partículas/mL	Z-Average (DLS)
Np LMW	272,0 ± 6,5	177,5 ± 9,7	8,32x10 ¹¹ ± 7,57x10 ¹⁰	481,6 ± 31,2
Np DSC	186,8 ± 5,4	149,0 ± 1,7	1,13x10 ¹² ± 1,03x10 ¹¹	203,9 ± 1,3
Np DLC	155,8 ± 5,0	109,2 ± 2,7	1,58x10 ¹² ± 7,62x10 ¹⁰	186,5 ± 16,8
Np TMC	439,6 ± 5,8	430,5 ± 6,7	1,02x10 ¹² ± 6,68x10 ¹⁰	444,3 ± 53,9
Np C-PEG	207,8 ± 4,2	138,7 ± 7,3	1,28x10 ¹² ± 5,58x10 ⁹	226,1 ± 11,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados apresentados na **Tabela 2** mostram que a técnica utilizada na medida influencia muito o tamanho aferido. Além disso, os tamanhos de DLS diferem dos tamanhos iniciais apresentados no experimento de estabilidade em função do tempo, pois as medidas da **Tabela 2** não são referentes ao dia 1. Apesar das duas técnicas se basearem no movimento Browniano para as medidas, o DLS

não apresenta uma boa resolução de picos quando a diferença dos tamanhos presentes na amostra é pequena, ou seja, tamanhos próximos acabam gerando apenas uma distribuição normal mais larga englobando varias subpopulações de tamanhos ligeiramente diferentes. Ademais, enquanto o DLS apresenta o tamanho relacionado à distribuição da intensidade, o NTA apresenta a distribuição por número. Como partículas maiores espalham mais luz, o DLS desloca a média para números maiores, visto que a intensidade da luz espalhada é proporcional a sexta potência do diâmetro. (67,70) Portanto, uma técnica é complementar a outra, apesar dos valores dos tamanhos serem diferentes.

A Np TMC é a que apresentou menor diferença dos tamanhos entre os dois métodos, isso se deve, principalmente, ao fato de ser a amostra menos polidispersa, apresentando apenas uma distribuição normal no gráfico gerado pelo NTA. O NTA oferece ainda dados de concentração de partículas por mL, sendo que a concentração média entre todas as nanopartículas é em torno de 10^{12} partículas/mL. Com isso é possível inferir que não há grande variação em relação as diferentes quitosanas utilizadas e o número de partículas/mL e, portanto, os testes de citotoxicidade não devem ser prejudicados devido à concentrações iniciais diferentes de cada Np nas amostras.

4.4.5 Análise de tamanho por AFM

O tamanho das Np sem ASO foi medido por AFM e está apresentado na Figura 24.

Figura 24 – Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas sem ASO. A primeira da esquerda é a Np LMW, à direita Np DSC, no meio à esquerda a Np DLC e à direita Np TMC e na ultima linha está a Np C-PEG centralizada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado por Yuan et al. o tamanho determinado por AFM foi menor do que aquele medido pelo raio hidrodinâmico, isto pode ser relacionado ao efeito do solvente na medida do raio hidrodinâmico pelas medidas feitas por DLS e NTA. (106) O raio hidrodinâmico é dependente do solvente, podendo ser maior ou menor, dependendo da natureza deste. Para a microscopia de força atômica, as nanopartículas passam por um processo de secagem que as desidrata, e, portanto não é uma medida referente ao raio hidrodinâmico. É possível observar nas imagens da Figura 24 alguns aglomerados e que todas as nanopartículas possuem formato próximo ao esférico. As Nps DSC e DLC apresentam menos aglomerados, isso pode ser um dos motivos de apresentarem tamanhos menores no DLS, já que esta técnica é muito sensível a agregados. Além disso, a Np TMC apresenta tamanhos maiores do que as outras nanopartículas e também não apresenta grandes aglomerados, e isto vai de acordo com o resultado obtido no NTA que indica haver uma única normal de distribuição apenas para esta Np.

4.4.6 Efeito de corona proteica

A formação de coronas proteicas na superfície das nanopartículas de quitosana foi avaliada e quantificada via ensaio BCA. Para isso, foram construídas curvas de calibração para a proteína BSA nas concentrações de 0 a 1,0 mg/mL, obtendo-se coeficientes de determinação R^2 0,9948 e 0,9931. A Tabela 3 apresenta os valores das concentrações de proteínas calculadas para cada uma das formulações. É válido ressaltar que todas as amostras apresentadas na tabela foram previamente incubadas com meio de cultura durante 24 horas, tempo considerado suficiente para a formação da corona proteica. Após esse período as proteínas fracamente adsorvidas, constituintes da *soft* corona, foram retiradas por meio de lavagem. As proteínas fortemente adsorvidas, conhecida como *hard* corona não dissociam no processo de centrifugação. (31) Como controle foi avaliada a absorbância das Nps sem contato com meio de cultura, os resultados indicaram uma absorbância semelhante a da concentração de 0 mg/mL. A Figura 25 mostra as Nps após 24 horas de incubação em DMEM com 10% FBS e antes do processo de centrifugação. É possível observar que nenhum agregado se formou neste período.

Figura 25 – Nps em DMEM com 10% de FBS após 24 h de incubação.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Concentração de proteínas totais calculadas pelo teste BCA para as nanopartículas em meio de cultura RPMI-1640 e DMEM, ambos suplementados com 10% de FBS.

Meio de cultura	Nanopartícula	Concentração (mg/mL) $\pm$ Desvio padrão
RPMI-1640	LMW	0,196 $\pm$ 0,019
	LMW ASO	0,182 $\pm$ 0,004
	DSC	0,180 $\pm$ 0,018
	DSC ASO	0,206 $\pm$ 0,010
	DLC	0,176 $\pm$ 0,028
	DLC ASO	0,188 $\pm$ 0,004
	TMC	0,239 $\pm$ 0,031
	TMC ASO	0,231 $\pm$ 0,013
	C-PEG	0,185 $\pm$ 0,013
	C-PEG ASO	0,189 $\pm$ 0,004
DMEM	LMW	0,182 $\pm$ 0,011
	DSC	0,169 $\pm$ 0,006
	DLC	0,157 $\pm$ 0,012
	TMC	0,183 $\pm$ 0,027
	C-PEG	0,169 $\pm$ 0,007

Fonte: Elaborada pela autora.

Realizando o teste T de Student (nível de significância de 5%) para as amostras, e comparando todas as nanopartículas com a Np LMW sem ASO, percebe-se que, quando utilizado o meio RPMI-1640, as únicas Nps a apresentarem diferenças significativas de concentrações de proteínas adsorvidas são as Np TMC e a Np TMC ASO, com concentrações maiores de proteínas totais. Por sua vez, quando o meio DMEM é utilizado, as Np LMW e TMC não apresentam diferenças significativas quanto as proteínas totais, entretanto, todas as outras apresentam uma

concentração de Nps significativamente inferior. Sabendo do comportamento diferencial dessas nanopartículas quando tituladas e considerando que o meio de cultura possui pH próximo de 8,0; foram realizadas medidas de potencial zeta das amostras sem ASO incubadas com meio de cultura. Desta forma, procurou-se entender a essência dessa adsorção diferencial das proteínas.

Independentemente da carga inicial da partícula, a carga com a corona proteica interfere na internalização das nanopartículas em sistemas celulares. Os valores de potencial zeta são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Dados de potencial zeta das Nps após incubadas 24 horas em meios de cultura RPMI - 1640 e DMEM.

Nanopartícula	Meio de Cultura	Potencial Zeta (mV) ± Desvio Padrão
LMW	RPMI-1640	-1,79 ± 0,533
	DMEM	-2,29 ± 0,212
DSC	RPMI-1640	-4,18 ± 0,028
	DMEM	-12,40 ± 0,071
DLC	RPMI-1640	-4,51 ± 0,375
	DMEM	-16,10 ± 0,566
TMC	RPMI-1640	30,60 ± 0,833
	DMEM	22,20 ± 0,252
C-PEG	RPMI-1640	2,88 ± 0,247
	DMEM	-0,63 ± 0,338

Fonte: Elaborada pela autora.

Através dos dados de potencial zeta apresentados acima, é possível observar que as Nps TMC não apresentam grande variação da carga após a incubação com os meios de cultura. Isto se deve provavelmente às suas aminas quaternizadas, que possuem uma carga positiva constante. Enquanto as outras Nps, ao serem ressuspendidas em meio de cultura, tendem a diminuir a carga, isto também pode ser observado na **Figura 22**, que em valores de pH próximos a 8 apresentam carga próximas de 0, já as Np TMC, apresentam carga superior. Essa carga diferencial pode ser a principal responsável pelas proteínas adsorvidas na superfície do nanomaterial, visto que Nps carregadas negativamente atrairão proteínas positivas e

Nps carregadas positivamente atrairão proteínas negativas. Como o meio RPMI-1640 apresenta maior variedade de aminoácidos e vitaminas, isso pode ter resultado nas diferenças apresentadas em relação à quantidade de proteínas totais adsorvidas entre os dois meios e, conseqüentemente, no potencial zeta também. (100-101)

Entretanto, sabe-se que a corona proteica de sistemas *in vitro* e *in vivo* são diferentes e, pensando em uma aplicação biológica real, questões como as levantadas por Shi et al. sobre outros fluidos, como o ambiente perivascular no caso de tumores sólidos, devem ser levadas em consideração. (23,27)

4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

O encapsulamento de fármacos, oligodeoxiribonucleotídeos, siRNA ou pDNA, pode ser acompanhado de mudanças tanto no tamanho quanto na carga das nanopartículas. Portanto, foi feita a caracterização dessas Np com ASO, os quais estão apresentados na Tabela 5 juntamente com os dados das nanopartículas sem ASO para melhor comparação.

Tabela 5 – Tamanho, Pdl e Potencial Zeta de Np e Np-ASO.

Nanopartícula		Z-Average	Pdl	Potencial Zeta
LMW	–	473,6 ± 4,2	0,412 ± 0,002	45,2 ± 0,5
	ASO	435,4 ± 6,3	0,315 ± 0,016	55,8 ± 0,5
DSC	–	205,8 ± 3,3	0,112 ± 0,080	36,4 ± 0,6
	ASO	218,3 ± 2,8	0,190 ± 0,019	34,9 ± 0,1
DLC	–	175,4 ± 3,3	0,221 ± 0,012	42,7 ± 0,4
	ASO	189,4 ± 3,7	0,205 ± 0,004	35,4 ± 0,5
TMC	–	322,8 ± 1,7	0,169 ± 0,017	27,9 ± 0,5
	ASO	529,5 ± 3,6	0,216 ± 0,006	48,2 ± 0,4
C-PEG	–	244,8 ± 2,6	0,339 ± 0,074	43,4 ± 0,2
	ASO	281,5 ± 6,7	0,357 ± 0,023	45,7 ± 0,1

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela **Tabela 5** percebemos que não ocorreu uma mudança muito expressiva dos parâmetros apresentados, exceto para a Np TMC cujo tamanho aumentou muito e o potencial zeta também. Entretanto, em geral, não houve um padrão de modificação, ou seja, a Np LMW diminuiu de tamanho enquanto as outras aumentaram e o potencial zeta da Np DSC e da Np DLC diminuiu, enquanto o das outras aumentou. Estas mudanças podem ocorrer devido à proporção de grupamentos amino na quitosana e fosfato no ASO. Portanto, a quantificação de encapsulamento é um fator importante.

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento foi utilizada a ultracentrifugação como forma de minimizar a interferência por partículas ainda em suspensão. A curva de calibração foi feita a partir da triplicata das medidas de cada concentração, sendo o R^2 da reta obtida de 0,9995, e a equação: $y = 0,2031x + 0,0197$, y é a absorbância e x a concentração em $\mu\text{mol/L}$. A quantificação foi realizada como descrito na metodologia, foi calculada a eficiência de encapsulamento descontando-se a absorbância do sobrenadante sem ASO (branco) e não descontando, considerando que a absorbância em 260 nm é totalmente referente ao ASO nesse segundo caso. Sendo assim, é possível obter uma faixa segura da porcentagem que foi encapsulada. Visto que o sobrenadante da própria Np possui absorção nesse comprimento de onda mesmo após a ultracentrifugação, quando não descontamos o branco a eficiência de encapsulamento diminui para todas as sínteses, em alguns casos mais que em outros, devido à absorção natural desses sobrenadantes ser diferente para cada quitosana. Esses dados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Eficiência de encapsulamento do ASO.

Amostra	Eficiência de encapsulamento (%)
Np LMW ASO	61,6 a 73,0
Np DSC ASO	81,1 a 97,8
Np DLC ASO	60,2 a 95,5
Np TMC ASO	84,4 a 91,5
Np C-PEG ASO	89,5 a 98,9

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar na **Tabela 6** que o encapsulamento do ASO nas Nps das quitosanas testadas foi eficiente, variando de 60,2%, quando a absorbância natural do sobrenadante da Np DLC não é desconsiderada, a 98,9% quando é feita retirada da possível interferência de fundo da Np C-PEG.

Veilleux et al. perceberam que a quitosana formava complexos mais estáveis e resistentes a liofilização com oligonucleotídeos de DNA do que aqueles formados com siRNA. (109) Ele também percebeu que para relações de N:P mais baixas, quando se tratando de siRNA, a natureza da sequência influenciava na estabilidade, ou seja, quanto maior a proporção de C-G, maior a tendência à agregação. Isso pode ter ocorrido no trabalho de Veilleux et al. já que a ligação C-G é feita por uma tripla ligação de hidrogênio, o que fornece maior estabilidade a essa molécula, diminuindo sua atração pela quitosana quando comparadas as sequências enriquecidas de A-T, as quais fazem somente duas pontes de hidrogênio. No caso dessa dissertação, o ASO utilizado é fita simples, e, portanto, a quantidade de C-G não deve influenciar na estabilidade do políplexo inicial e nem na eficiência de encapsulamento.

4.6 TESTES *in vitro*

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular

Os testes com a linhagem NB-4, leucemia promielótica humana, foram conduzidos de modo diferente daqueles com as outras linhagens por se tratar de uma linhagem não aderente. As células foram plaqueadas, após 6 horas as Nps foram adicionadas e as células incubadas por mais 18 ou 42 horas antes da realização do teste de MTT. A partir da observação dos gráficos de 18 e 42 horas de MTT para esta linhagem (**Figura 26** e **Figura 27**, respectivamente) nota-se que a maioria dos tratamentos não causou uma diferença significativa na viabilidade, entretanto, após 48 horas, mais tratamentos passaram a apresentar diferenças, inclusive o de menor concentração de Np DSC. Para esta linhagem, a Np DLC mostrou ser a menos e a Np TMC a mais tóxica em comparação às outras Nps testadas.

Figura 26 – Teste de MTT de 18 horas para a linhagem celular NB-4.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Teste de MTT de 42 horas para a linhagem celular NB-4.
Fonte: Elaborada pela autora.

Duas linhagens de carcinoma hepático foram utilizadas, a HTC e a HepaRG. Para a linhagem HTC (Figura 28 e Figura 29) é possível observar que ocorreu

diferença significativa no crescimento para todos os tratamentos nos dois tempos analisados. Além disso, é possível observar que para a Np LMW, Np DSC e Np C-PEG aparentemente não ocorreu variação na viabilidade em relação às concentrações utilizadas. Para a Np DLC e Np TMC parece existir uma dose dependente na faixa testada, isto é, mais aparente na Np TMC, cuja amostra mais concentrada passa de uma viabilidade de 17% em 24 horas para 8% em 48 horas e nas outras concentrações se mantem praticamente constante ou aumentou entre os dois tempos analisados.

Figura 28 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular HTC.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular HTC.
Fonte: Elaborada pela autora.

A próxima linhagem a ser apresentada é a HepaRG (**Figura 30** e **Figura 31**). Nesta linhagem celular, diferentemente da HTC, alguns tratamentos apresentaram diferença significativa, mas no sentido de maior viabilidade celular. Este é o caso dos tratamentos com Np LMW 1:50 e Np DSC 1:100. Novamente, os tratamentos com as Nps DLC e TMC resultaram em menor viabilidade e, para esta linhagem, a Np C-PEG também apresentou uma viabilidade menor do que o tratamento com a Np LMW e Np DSC em 24 horas. Entretanto, após 48 horas os tratamentos com as menores concentrações de Np C-PEG passam a não ser estatisticamente diferente do controle e das menores concentrações de Np LMW e Np DSC.

Figura 30 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular HepaRG.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular HepaRG.
Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, a última linhagem testada foi uma linhagem de rim de *hamster*, BHK-570. Diferentemente das outras linhagens, para essa célula muitos dos tratamentos

indicaram um crescimento maior do que 100%. Em 24 horas apenas a maior concentração de Np DLC e as duas primeiras de Np TMC resultaram em crescimento menor do que o controle. Em 48 horas também não ocorreu grandes mudanças dos dados de 24 horas. A Np TMC novamente gera uma mortalidade alta nas maiores concentrações, chegando a apenas 2% de viabilidade após 48 horas.

Figura 32 – Teste de MTT de 24 horas para a linhagem celular BHK-570.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 – Teste de MTT de 48 horas para a linhagem celular BHK-570.
Fonte: Elaborada pela autora.

Embora o teste de MTT feito por Mao et al. comparasse apenas a toxicidade das quitosanas de diferentes pesos moleculares e não de Nps feitas dessas quitosanas, ele não observou toxicidade relacionada ao tamanho do polímero utilizado, apenas em relação a concentração. (91) Nos dados aqui apresentados, é possível observar que apesar da linhagem NB-4 e BHK-570 não apresentarem diferenças significativas na proliferação celular, as outras apresentam quando tratadas com Np DLC nas maiores concentrações. Portanto, assim como ele propõe, essa toxicidade pode estar relacionada a linhagem celular sendo utilizada no estudo.

Nessa dissertação, foram utilizadas 4 linhagens, de 3 espécies diferentes e 3 tecidos também diferentes o que torna interessante para entender como as mesmas formulações, do mesmo polímero, podem gerar estas respostas desiguais. Isto ocorre não só por causa do meio em que as nanopartículas foram ressuspensas, mas também pela própria natureza da célula, por exemplo, se é aderente ou não, o metabolismo celular, se é cancerosa ou saudável e a capacidade regenerativa. Estas características são determinadas pela natureza do tecido de que elas originam, mas dependem também das mutações e do proteoma.

Dentre as linhagens testadas, a saudável foi a com melhor resposta ao tratamento, a BHK-570. Assim, seria interessante em estudos futuros ver a

correlação deste resultado com outras linhagens saudáveis e de câncer renal para saber se realmente as células cancerosas são mais sensíveis a estas nanopartículas ou se apenas o tecido renal é mais resistente.

Cassetari et al. também conduziram um estudo comparando a toxicidade de quitosanas modificadas com PEG, atribuindo a menor toxicidade da quitosana-PEGlada aos prováveis efeitos de proteção da carga positiva da quitosana, impedindo-a da interação com a membrana celular, o que resultaria em toxicidade. Além disso, ele mostra que a toxicidade depende do grau de substituição, sendo que as amostras com menor grau resultam em uma dose-dependente de citotoxicidade, o que pode ter ocorrido com a Np C-PEG nas células testadas aqui, já que não ocorreu uma intensa modificação da cadeia polimérica da quitosana com o PEG (89-90)

Kean et al. compararam a toxicidade de quitosanas de dois pesos moleculares (3-6 kDa e aproximadamente 100 kDa) com diferentes graus de trimetilação. Nesse teste, as células foram incubadas por 6 ou 24 horas e posteriormente, o meio com o polímero foi retirado e as células foram incubadas com meio novo por mais 24 horas. Eles encontraram uma relação entre a viabilidade e o grau de trimetilação, além disso, foi possível observar uma relação entre o tamanho do polímero, sendo que o maior influenciou mais do que o menor na viabilidade, mesmo com o mesmo grau de modificação. (110) O tempo de exposição também foi relevante, sendo que de 6 para 24 horas de exposição, a viabilidade diminuiu. Este efeito também foi visível em alguns casos nessa dissertação, principalmente na maior concentração da Np TMC.

Amidi et al. trimetilaram a quitosana, mas partiram de uma quitosana de 177 kDa. Apesar do tamanho não ser muito diferente da utilizada nos testes de MTT aqui apresentados, pelo produto não advir do mesmo fabricante, o grau e padrão de acetilação podem influenciar a reação. Eles obtiveram uma modificação de 25% e a síntese das Nps utilizou a proporção 5,5 de quitosana para 1 de TPP, com Tween 80 na formulação. Entretanto, eles não observaram citotoxicidade nas células de Calu-3 tratadas com nanopartículas, apenas com concentrações mais altas de TMC. Esta diferença com os dados aqui apresentados pode ter ocorrido devido às linhagem serem diferente, a maior proporção de trimetilação, as concentrações de síntese ou até mesmo a estruturada quitosana. (103)

4.6.2 Análise de fluorescência por microscopia confocal

As imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência estão apresentadas a seguir, tanto para os valores de 18 horas de tratamento quanto para os de 42 horas. Nelas é possível observar visualmente uma menor fluorescência das células tratadas durante 18 horas, porém não é possível perceber o mesmo efeito após 42 horas. Além disso, como já apresentado pelos testes de MTT e discutidos anteriormente, é possível observar que as células tratadas com Np TMC apresentam menor viabilidade do que as com outros tratamentos.

A presença de células, na mesma imagem, com mais ou menos expressão de GFP pode estar relacionada à etapa do ciclo celular em que cada uma está, visto que durante o ciclo celular existem diferenças nas quantidades de proteínas, RNAs e DNA presentes. (111)

Um fator importante é que as células foram tratadas nas concentrações de 1:50, exceto para a Np TMC que se refere a diluição de 1:100. Essas concentrações foram escolhidas baseadas no estudo de MTT.

A **Figura 34** apresenta as imagens obtidas das células tratadas com Nps sem ASO durante 18 horas. É possível observar que ainda existe muito espaço para crescimento celular e que várias células apresentam uma fluorescência bem intensa, enquanto outras apresentam um pouco menos.

Figura 34 – Imagens de microscopia confocal de 18 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps sem ASO.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na **Figura 35** estão apresentadas as imagens das células tratadas com Nps com ASO, nelas é possível observar que ocorreu uma diminuição da intensidade de GFP expressa, sem diminuição do número de células. Isto ocorreu provavelmente devido à entrega do ASO nas células e interrupção da tradução por meio da atividade da RNase H.

Figura 35 – Imagens de microscopia confocal de 18 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps com ASO.

Fonte: Elaborada pela autora.

A **Figura 36** novamente é o controle de 42 horas das células. Essas foram tratadas com Nps sem ASO e é possível observar uma maior densidade celular, com expressão de GFP, visualmente, semelhante à da imagem de 18 horas.

Figura 36 – Imagens de microscopia confocal de 42 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps sem ASO.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao observar a **Figura 37**, percebe-se que os níveis de expressão das GFP aumentaram o que indica que ocorreu uma diminuição da atividade inibitória proveniente do ASO.

Figura 37 – Imagens de microscopia confocal de 42 horas de tratamento das células NB-4 tratadas com Nps com ASO.

Fonte: Elaborada pela autora.

As células tratadas nessas concentrações, não apresentaram alterações morfológicas visuais, exceto as tratadas com Np TMC e Np TMC ASO que tiveram um crescimento espacial diferente das outras, elas formam certos aglomerados. Vale lembrar que a inibição da GFP não altera o transcriptoma celular natural.

Para quantificar a fluorescência, foi utilizado o programa Image J, com um número amostral de pelo menos 150 células, exceto para as tratadas com Np TMC e Np TMC ASO que não possuíam esse número de células nas imagens obtidas em 18 horas. Utilizou-se a fórmula:

$$\text{Fluorescência} = \text{densidade integrada} - (\text{área da célula} \times \text{média do fundo})$$

para determinação da fluorescência e em seguida foi feita porcentagem em relação ao controle de células não tratadas com nenhuma Np.

Com isso foi possível construir os gráficos apresentados na **Figura 38** que demonstram numericamente que ocorreu uma supressão relativa da expressão da

GFP para todas as células tratadas com ASO em 18 horas, o que já era possível visualizar na **Figura 35**, e após 42 horas, essa diferença praticamente se extingue.

Figura 38 – Gráfico da fluorescência relativa das células tratadas com nanopartículas e nanopartículas com ASO. A esquerda são apresentados os dados relativos a 18 horas de tratamento e a direita os relativos a 42 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Aqui se torna interessante ressaltar que a Np LMW foi a que apresentou menor eficiência de encapsulamento e nos dados de 18 horas é a única que apresenta, junto com o controle ASO, uma supressão relativa menor que 50%. (10) De acordo com Achenbach et al. não existe um consenso sobre o que pode ser considerada uma supressão de expressão, podendo ser de 50-100% da diminuição da concentração do mRNA, expressão da proteína ou atividade enzimática, sendo assim, exceto para as amostras citadas acima, todas as outras causam supressão em 18 horas. (14) Miyagishi et al. também observaram uma redução relativa da atividade da luciferase entre 35 e 77%, dependendo do sítio de atuação do ASO após 24 horas da transfecção com *Oligofectamine*. (10) De acordo com o estudo realizado por Dung et al. as Nps de quitosana-ASO com posterior adição de TPP, como as descritas aqui, possuem uma liberação de 41,3% dos oligonucleotídeos em PBS com pH 7,0, ele ainda sugere que essa baixa liberação ocorre devido à combinação dos efeitos de impedimento estérico e interação eletrostática e atinge o máximo dentro das 15 primeiras horas. (112) Além disso, Vickers et al. observaram que ASOs de segunda geração com *Lipofectin* atingiram uma atividade máxima em 8 horas para inibição do gene Bcl-X em células T24. (11) Estes dados corroboram com os dados obtidos, os quais mostram que depois das primeiras 18 horas de tratamento a expressão da GFP voltou a aumentar, o que pode ocorrer devido ao efeito conjunto de quatro fatores: a superexpressão da GFP, a possível degradação

dos ASOs liberados devido à atuação de endo e exonucleases produzidas pelas células, a não liberação dos ASOs restantes durante este período de forma tão rápida como nas primeiras horas e o tempo de duplicação celular (que para a NB4 é de 36 a 40 horas). (19,105-106)

Ademais, a Np DSC ASO apresentou a maior supressão, mais de 60% da fluorescência em 18 horas, isso pode ter ocorrido, pois, além de possuir um tamanho menor do que a Np LMW, o que pode facilitar a interiorização celular e degradação com consequente desprendimento do ASO, ela apresenta uma eficiência de encapsulamento entre 81,1 e 97,8%.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados nessa dissertação é possível concluir que alterações na cadeia polimérica da quitosana, podem influenciar não só em propriedades físico-químicas, mas também biológicas. Suas nanopartículas apresentam tamanho adequado à terapia, elas possuem boa estabilidade em relação à temperatura e tempo. Quando tituladas, exceto a Np TMC, encontram seu ponto isoelétrico entre os pH 8,6 e 9,3, sendo bastante estáveis em pH ácidos, o que, aliado à propriedade de mucoadesão, a torna muito interessante para administrações orais. Além disso, é possível concluir que diferentes técnicas de análise de tamanho, mesmo quando tem como base o mesmo fundamento, podem resultar em tamanhos diferentes, dependendo do processamento de cada equipamento. Quando técnicas que envolvem um preparo das amostras diferente são confrontadas uma diferença marcante pode ser observada. A corona proteica pode ser responsável por diversas respostas imunes quando em um organismo vivo, portanto, aqui procurou-se verificar se ocorreria mudança entre a quantidade de proteínas adsorvidas na superfície das nanopartículas e a carga decorrente destas. A princípio não foi possível observar precipitados nas amostras em meio de cultura o que indica que apesar do pH no meio em que as nanopartículas se encontravam ter aumentado, as proteínas presentes adsorvem em sua superfície conferindo uma estabilidade maior. A Np TMC apresentou maior concentração de proteínas em sua superfície quando em RPMI-1640, isto pode ter ocorrido devido à sua carga permanente positiva. Enquanto nas outras nanopartículas, no pH do meio de cultura ocorre uma perda de carga que pode resultar em atração de proteínas diferentes. Entretanto, estudos *in vivo*, por apresentarem meios fisiológicos diferentes, podem apresentar respostas diferentes. Nos estudos de citotoxicidade as linhagens de fígado se mostraram mais sensíveis às nanopartículas em geral, enquanto a linhagem de rim apresentou viabilidade, na grande maioria dos casos, igual ou superior ao controle. A Np TMC apresentou uma toxicidade mais alta do que as outras em todas as células, chegando a atingir menos de 10% de viabilidade nas concentrações máximas estudadas para algumas linhagens. Esta maior mortalidade pode ser causada devido à sua carga, a qual sendo mais positiva é mais atraída pelas membranas celulares negativas e pode ser mais internalizadas e/ou causar danos às membranas. Já foi descrito na literatura relações entre a trimetilação e a

citotoxicidade, entretanto, a citotoxicidade é dependente também de fatores como o comprimento da cadeia polimérica, a estrutura (se α ou β) e ainda o grau e padrão de acetilação, tornando muito difícil a comparação entre os estudos de forma muito eficiente. Portanto, a modificação ou não da quitosana deve ser estudada caso a caso, dependendo da linhagem celular a ser tratada e da quantidade de ASO a ser entregue. As ferramentas computacionais para o desenho do ASO se mostraram bastante apropriadas, visto que o ASO resultante reduziu a expressão da GFP mesmo sem o nanocarreador. Ocorreu uma boa eficiência de encapsulamento com os parâmetros testados, além disso, as nanopartículas empregadas nos testes *in vitro* não passaram por uma ultracentrifugação o que pode ter reduzido o número de partículas aplicadas no tratamento no final, mas, mesmo assim, verificou-se uma redução significativa da fluorescência da NB-4 em 18 horas, atingindo mais de 60% para a Np DSC ASO. O retorno da expressão após 42 horas pode ser devido à não liberação do restante dos ASOs que estariam mais internalizados no nanocarreador, ao fato de a proteína ser superexpressa, ao tempo de duplicação celular ou a degradação dos ASOs. Apesar do ASO não encapsulado apresentar uma resposta semelhante, este resultado foi observado em uma placa de cultura, entretanto, *in vivo*, nos quais esta pequena sequência deveria atravessar barreiras biológicas até atingir a célula alvo, provavelmente não seria notada uma diminuição da expressão tão efetiva como se protegida por um nanocarreador. Com o aumento tanto nas pesquisas quanto no número de empresas direcionadas a pesquisa em terapias com material genético, seja ASO, siRNA ou mRNA, é interessante associar a pesquisa em carreadores, uma vez que o sucesso da primeira depende da sua entrega adequada, seja em uma doença metabólica, câncer ou algum tipo de imunização preventiva.

REFERÊNCIAS

- 1 GRIFFITHS, A. J. F. et al. DNA: estrutura e replicação. In: _____ **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 225–251.
- 2 GRIFFITHS, A. J. F. et al. O enfoque genético à biologia. In: _____ **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1–24.
- 3 KRESGE, N. et al. Chargaff's rules: the work of Erwin Chargaff. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. e21–e21, 2005.
- 4 GRIFFITHS, A. J. F. et al. RNA: transcrição e processamento. In: _____ **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 253–273.
- 5 GRIFFITHS, A. J. F. et al. Proteínas e sua síntese. In: _____ **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 275–300.
- 6 CROOKE, S.T. et al. Mechanisms of antisense drug action, an introduction. In: CROOKE, S. T. (Ed.). **Antisense drug technology**: principles, strategy, and applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006, p. 3–46.
- 7 YELIN, R. et al. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 379–386, 2003.
- 8 ZAMECNIK, P. C.; STEPHENSON, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 1, p. 280–284, 1978.
- 9 NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. The human genome project completion: frequently asked questions. 2010. Disponível em: <<https://www.genome.gov/11006943/>>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- 10 MIYAGISHI, M. et al. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2003.
- 11 VICKERS, T. A. et al. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. a comparative analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7108–7118, 2003.
- 12 JACKSON, A. L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 635–637, 2003.
- 13 SCACHERI, P. C. et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 1892–1897, 2004.
- 14 ACHENBACH, T. V. et al. Oligonucleotide-based knockdown technologies: Antisense versus RNA interference. **ChemBioChem**, v. 4, n. 10, p. 928–935, 2003.

- 15 MOKHTARZADEH, A. et al. Biodegradable nano-polymers as delivery vehicles for therapeutic small non-coding ribonucleic acids. **Journal of Controlled Release**, v. 245, p. 116–126, 2017. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.017.
- 16 SHORROCK, H. K.; GILLINGWATER, T. H.; GROEN, E. J. N. Overview of current drugs and molecules in development for spinal muscular atrophy therapy. **Drugs**, v. 78, n. 3, p. 293–305, 2018.
- 17 SHIMADA, T. et al. Heat shock protein 27 knockdown using nucleotide-based therapies enhances sensitivity to 5-FU chemotherapy in SW480 human colon cancer cells. **Oncology Reports**, v. 39, n. 3, p. 1119–1124, 2018.
- 18 PRABHA, S. et al. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1–2, p. 105–115, 2002.
- 19 DAVIS, M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1067–1070, 2010.
- 20 GANJU, A. et al. miRNA nanotherapeutics for cancer. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 424–432, 2017.
- 21 ZENG, X. et al. Genome-wide RNAi screen identifies networks involved in intestinal stem cell regulation in drosophila. **Cell Reports**, v. 10, n. 7, p. 1226–1238, 2015.
- 22 RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.
- 23 SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20–37, 2017.
- 24 LUQUE-Alcaraz, A. G. et al. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. **RSC Advances**, v. 6, n. 64, p. 59250–59256, 2016. doi: 10.1039/C6RA06563E.
- 25 BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3303–21, 2011.
- 26 CHAKRABORTY, S. et al. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7722–7731, 2011.
- 27 CANCINO, J. et al. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014.
- 28 WANG, J. et al. More effective nanomedicines through particle design. **Small**, v. 7, n. 14, p. 1919–1931, 2011.
- 29 TYAGI, P.; SUBRAMONY, J. A. Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery: Key learnings and future outlooks as we think small. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 159–168, 2018. doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.009.

- 30 AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483–507, 2016. doi: 10.2147/DDDT.S99651.
- 31 BARRÁN-Berdón, A. L. et al. Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. **Langmuir**, v. 29, n. 21, p. 6485–6494, 2013.
- 32 RAMASAMY, T. et al. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: a comprehensive review. **Journal of Controlled Release**, v. 258, p. 226–253, 2017. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.04.043.
- 33 LIECHTY, W. B. et al. Polymers for drug delivery systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, p. 149–173, 2010. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.
- 34 VILA, A. et al. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, n. 1-3, p. 15–24, 2002.
- 35 CANCINO-BERNARDI, J. et al. Current challenges in the commercialization of nanocolloids: toxicology and environmental issues. In: SÁNCHEZ-DOMINGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-ABREU, C. (Ed.) **Nanocolloids: a meeting point for scientists and technologists**. Berlin: Elsevier, 2016. p. 427–463.
- 36 GATTER, K. C. et al. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 5, p. 539–545, 1983.
- 37 NAIDU, P. S. R. et al. The protein corona of PEGylated PGMA-based nanoparticles is preferentially enriched with specific serum proteins of varied biological function. **Langmuir**, v. 33, n. 45, p. 12926–12933, 2017.
- 38 FREITAS JUNIOR, R. A. Cytometrics. In: _____ **Nanomedicine: basic capabilities**. Georgetown: Landes Bioscience, 1999. v.1.
- 39 BATISTA, P. et al. Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive proteins and peptides. **Peptides**, v. 101, p. 112–123, 2018. doi: 10.1016/j.peptides.2018.01.002.
- 40 KÜÇÜKTÜRKMEN, B. et al. Co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide by lipid-polymer hybrid nanoparticles and effects on glioblastoma cells. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 1, p. 12-21, 2017.
- 41 RAMEZANI, M.; EBRAHIMIAN, M.; HASHEMI, M. Current strategies in the modification of PLGA-based gene delivery system. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 728-739, 2017.
- 42 CHENG, X. et al. Lipid nanoparticles loaded with an antisense oligonucleotide gapmer against Bcl-2 for treatment of lung cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 2, p. 310-320, 2016.

- 43 YUAN, P. et al. Simultaneous imaging of endogenous survivin mRNA and on-demand drug release in live cells by using a mesoporous silica nanoquencher. **Small**, v. 13, n. 27, 2017. doi: 10.1002/smll.201700569.
- 44 CHEN, L. et al. Improving the delivery of SOD1 antisense oligonucleotides to motor neurons using calcium phosphate-lipid nanoparticle. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 476, 2017. doi: 10.3389/fnins.2017.00476.
- 45 ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505–515, 2008.
- 46 GHOSH, P. Basic concepts of high polymer systems. In: _____ **Polymer science and technology**: plastics, rubbers, blends and composites. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011.
- 47 WANG, Y. et al. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 2, p. 26, 2016.
- 48 VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.
- 49 JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769–2776, 2003.
- 50 MAO, S. et al. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1–2, p. 45–54, 2004.
- 51 TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 2, p. 137–144, 2001.
- 52 JUNG, J.; ZHAO, Y. Impact of the structural differences between α - and β -chitosan on their depolymerizing reaction and antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8783–8789, 2013.
- 53 CAMPANA FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.
- 54 MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. A estrutura de carboidratos e lipídios. In: _____ **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 87–98.
- 55 XU, J. et al. Preparation and evaluation of vancomycin-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Polymers**, v. 7, n. 9, p. 1850–1870, 2015.
- 56 ALI, S. W. et al. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles with enhanced antimicrobial activity. **International Journal of Nanoscience**, v. 10, n. 04-05, p. 979–984, 2011.

- 57 NALLAMUTHU, I. et al. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 203–211, 2014.
- 58 LIU, C. G. et al. Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1728–1733, 2005.
- 59 KALLIOLA, S. et al. The pH sensitive properties of carboxymethyl chitosan nanoparticles cross-linked with calcium ions. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 153, p. 229–236, 2017.
- 60 ZHU, J. et al. Polymeric antimicrobial membranes enabled by nanomaterials for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 550, p. 173–197, 2018.
- 61 SANTOS-CARBALLAL, B. et al. Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13567, 2015. doi: 10.1038/srep13567.
- 62 USPTO. **Patent full-text and image database**. Disponível em: <<http://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/search-bool.html>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- 63 PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 101–168.
- 64 COBRA, P. F. **Aplicações de ressonância magnética nuclear em estudos metabolômicos de processos biológicos**. 2016. 105 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 65 PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia no infravermelho. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 15–100.
- 66 PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia no ultravioleta. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 365–398.
- 67 SIZE theory. In: **ZETASIZER NANO SERIES**: user manual. United Kingdom: Malvern Instruments, 2013. p. 11-1-11–8.
- 68 RECORDS and Reports - viewing the results. In: **ZETASIZER NANO SERIES**: user manual. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd., 2013. p. 4-1-4–20.
- 69 ZETA potential theory. In: **ZETASIZER NANO SERIES** : user manual. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd., 2013. p. 13-1-13–12.
- 70 FILIPE, V. et al. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.
- 71 **NANOSIGHT NS300** - user manual. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd., 2017.
- 72 VAHABI, S. et al. Atomic force microscopy application in biological research: a review study. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 76–83, 2013.

73 PETERSON, D. A. Confocal microscopy. In: KOMPOLITI, K.; METMAN, L. V. (Ed.). **Encyclopedia of movement disorders**. Oxford: Academic Press, 2010. p. 250–252.

74 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Blastx**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>. Acesso em: 14 fev. 2018.

75 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Introducing the BLAST homepage and form elements/functions of selected search pages**. Disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2018.

76 SEQUENCE EDITOR. **Convert DNA and RNA sequences**. generate antiparallel, complement and inverse sequences. Disponível em: <<http://www.fr33.net/seqedit.php>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

77 MATHEWS, D. H. RNA secondary structure analysis using RNAstructure. **Current Protocols in Bioinformatics**, 2006. doi: 10.1002/0471250953.bi1206s13.

78 MATHEWS LAB. **Computational biology of RNA**. Disponível em: <<https://rna.urmc.rochester.edu/research.html>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

79 CURTI, E. et al. Methylation of chitosan with Iodomethane: effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. **Macromolecular Bioscience**. v.3, n. 10, p. 571–576, 2003.

80 FISHMAN, A. et al. A simple preparation of PEG-carboxylates by direct oxidation. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 12, p. 2309–2312, 2004.

81 SIGMA ALDRICH. **Bicinchoninic acid protein assay kit**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/bca1bul.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

82 CHENG, M. et al. Rapid preparation and characterization of chitosan nanoparticles for oligonucleotide. **Current Applied Physics**, v. 10, n. 3, p. 797–800, 2010.

83 KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 216–225, 2006.

84 GRIPON, P. et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15655–60, 2002.

85 RODRIGUES, S. et al. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 615–641, 2012.

86 MCCLOY, R. A. et al. Partial inhibition of Cdk1 in G2phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, v. 13, n. 9, p. 1400–1412, 2014.

- 87 REUTER, J. S.; MATHEWS, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010. doi: 10.1186/1471-2105-11-129.
- 88 MATHEWS, D. H. et al. Predicting oligonucleotide affinity to nucleic acid targets. **RNA**, v. 5, n. 11, p. 1458–1469, 1999.
- 89 MATVEEVA, O. V. et al. Thermodynamic criteria for high hit rate antisense oligonucleotide design. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 17, p. 4989–4994, 2003.
- 90 PENISTON, Q.P.; JOHNSON, E.L. **Process for depolymerization of chitosan**. US3922260, 24 Aug. 1973, 25 Nov. 1975.
- 91 MAO, S. et al. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1-2, p. 45–54, 2004.
- 92 SANTOS, A. et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 9, 2015. doi.org/10.1590/1981-6723.11315
- 93 MOHAMED SAAT, A.; JOHAN, M. R. The surface structure and thermal properties of novel polymer composite films based on partially phosphorylated poly(vinyl alcohol) with aluminum phosphate. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/439839.
- 94 BRITTO, D. et al. Quaternary salts of chitosan: history, antimicrobial features, and prospects. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, p. 1–12, 2011. doi.org/10.1155/2011/312539.
- 95 MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 20, n. 5, p. 1057–1079, 2009.
- 96 CASETTARI, L. et al. Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2854–2865, 2010.
- 97 CASETTARI, L. et al. PEGylated chitosan derivatives: synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 5, p. 659–685, 2012.
- 98 PRAMANIK, S. et al. In vitro study of surface modified Poly(ethylene glycol)-impregnated sintered bovine bone scaffolds on human fibroblast cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9806, 2015. doi:10.1038/srep09806.
- 99 LUO, Q. et al. Synthesis of PEGylated chitosan copolymers as efficiently antimicrobial coatings for leather. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 22, 2016. doi.org/10.1002/app.43465.
- 100 CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125–132, 1997.

101 SAWTARIE, N. et al. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 157, p. 110–117, 2017. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.055.

102 FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 90, p. 21–27, 2012. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.

103 AMIDI, M. et al. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1–2, p. 107–116, 2006.

104 JONASSEN, H. et al. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 11, p. 3747–3756, 2012.

105 LAVERTU, M. et al. Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 640–650, 2008.

106 YUAN, Y. et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 6, p. 515–526, 2009.

107 VITROCELL embriolife meio RPMI-1640. Disponível em: <http://www.vitrocell.com.br/vitrocell_bularpmi.html>. Acesso em: 19 mar. 2018.

108 VITROCELL embriolife meio dulbeco mem. Disponível em: <http://www.vitrocell.com.br/vitrocell_dmem.html>. Acesso em: 19 mar. 2018.

109 VEILLEUX, D. et al. Lyophilisation and concentration of chitosan/siRNA polyplexes: influence of buffer composition, oligonucleotide sequence, and hyaluronic acid coating. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 512, p. 335–345, 2018. doi: 10.1016/j.jcis.2017.09.084.

110 KEAN, T. et al. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 643–653, 2005.

111 VICKARYOUS, M. K.; HALL, B. K. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 3, p. 425–455, 2006.

112 DUNG, T.H. et al. Chitosan-TPP nanoparticle as a release system of antisense oligonucleotide in the oral environment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 11, p. 3695–3699, 2007.

113 LANOTTE, M. et al. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). **Blood**, v. 77, n. 5, p. 1080–1086, 1991.

ANEXO A

Figura 39 – Segunda estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 – Terceira estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 – Quarta estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 42 – Quinta estrutura de menor energia livre do RNA mensageiro da GFP gerada pelo programa RNAstructure.

Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO B

Figura 43 – Estabilidade Np LMW (tamanho x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 44 – Estabilidade Np DSC (tamanho x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 45 – Estabilidade Np DLC (tamanho x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 46 – Estabilidade Np TMC (tamanho x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 47 – Estabilidade Np C-PEG (tamanho x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO C

Figura 48 – Estabilidade Np LMW (potencial zeta x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 49 – Estabilidade Np DSC (potencial zeta x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 50 – Estabilidade Np DLC (potencial zeta x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 51 – Estabilidade Np TMC (potencial zeta x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 52 – Estabilidade Np C-PEG (potencial zeta x pH).
Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO D

Figura 53 – Estabilidade Np LMW (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 54 – Estabilidade Np DSC (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 55 – Estabilidade Np DLC (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 56 – Estabilidade Np TMC (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 57 – Estabilidade Np C-PEG (tamanho x temperatura).
Fonte: Elaborada pela autora.