

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA

FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA

**Nanopartículas formadas por proteínas recombinantes
modulares como plataformas de gene delivery e combate às células tumorais**

São Paulo
2023

FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA

**Nanopartículas formadas por proteínas recombinantes
modulares como plataformas de gene delivery e combate às células tumorais**

Versão Original

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

Área de concentração: Engenharia de Bioprocessos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

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

São Paulo, 08 de maio de 2023

Assinatura do autor: Fernanda S. de Oliveira

Assinatura do orientador: Adriano Rodrigues Goni

CATALOGAÇÃO

Catálogo-na-publicação

Oliveira, Fernanda
Nanopartículas formadas por proteínas recombinantes modulares como plataformas de gene delivery e combate às células tumorais / F. Oliveira -- versão corr. -- São Paulo, 2023.
93 p.

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

1.Nanopartículas 2.Proteínas recombinantes 3.Terapia gênica 4.siRNA.
5.Células tumorais I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fernanda Santos de Oliveira.

Título: Nanopartículas formadas por proteínas recombinantes modulares como plataformas de gene delivery e combate às células tumorais.

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Seja a mudança que você quer ver no mundo.

Mahatma Ghandi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais pelo suporte e apoio financeiro desde a época em que fiz cursinho para entrar na graduação, sem dúvidas sem eles isso tudo não seria possível.

Ao meu orientador, professor Dr. Adriano R. Azzoni, pela paciência, conhecimento passado e apoio prestado. Para mim é um grande exemplo de profissional e uma pessoa incrível, me inspirou a ser melhor em vários âmbitos.

Ao Dr. Geraldo Santana por ter aberto as portas do seu laboratório no Instituto Butantan quando foi necessário, nos momentos críticos da pandemia, e pela colaboração intelectual ao projeto.

Aos pesquisadores e amigos do GEnBio pelas trocas de experiência e conhecimento, conversas, e ajuda técnica ao longo desses anos. Principalmente ao Professor Dr. Aldo Tonso por ter permitido acesso e uso de seu laboratório para os ensaios com as células, foi de extrema importância.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim, me deram força, suporte e me faziam acreditar que tudo isso era possível, e também compartilhavam de momentos de diversão, alegria e distração, tão necessários à nossa vida.

Ao apoio psicológico e psiquiátrico fornecido pela USP por meio do HUSP, em tempos de pandemia e entre tantas dificuldades e problemas pessoais ao longo do desenvolvimento desse projeto, com certeza ter acesso e poder cuidar da minha saúde mental foi trivial para conseguir concluir esse projeto que é um grande orgulho para mim.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro ao projeto com o Auxílio Universal CNPq (Nº 430205/2018-0). À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio, Código Financeiro 001, e pela bolsa de mestrado a mim confiada do início até o sétimo mês de execução desse projeto.

Por fim, meu profundo agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Mestrado a mim concedida (Processo Nº 2020/00616-5) e com a qual pude desenvolver e concluir este estudo.

RESUMO

Terapias avançadas, como a terapia gênica, têm sido amplamente estudadas para o tratamento do câncer. Muitos destes estudos baseiam-se no uso de vetores virais para a entrega de ácidos nucleicos para as células alvo. No entanto, ainda existem problemas recorrentes nesses estudos, tais como; 1) a dificuldade da entrega gênica para células tumorais devido à presença de barreiras físicas, enzimáticas e difusionais; 2) a estimulação de resposta inflamatória pelo sistema imune devido ao uso de vetores virais e; 3) os custos elevados para produção destes vetores. Uma alternativa para a superação destes obstáculos é o uso de proteínas recombinantes especificamente desenhadas para entrega gênica e combate às células tumorais. São, em geral, proteínas modulares, multifuncionais e capazes de mimetizar a habilidade dos vírus de explorar as sinalizações e respostas extra- e intracelulares para infectar as células. Dessa forma, o principal objetivo deste mestrado foi o desenvolvimento e caracterização de proteínas recombinantes multifuncionais capazes de realizarem eficientemente o transporte de material genético (RNA de interferência) para o interior de células tumorais. Para isso, a proteína repórter GFP foi fusionada a uma desintegrina (Echistatina) servindo como domínio de direcionamento para células tumorais. A proteína também contém uma poliarginina (R6) que interage e condensa o material genético a ser entregue. Quatro diferentes construções gênicas foram sintetizadas e expressas em *Escherichia coli*: construção 1 – completa (H6-R6-GFP-ECH); construção 2 - sem Echistatina (H6-R6-GFP); construção 3 - sem a sequência R6 (H6-GFP-ECH); e construção 4 - (H6-R9-GFP-ECH), contendo a sequência R9 com potencial de induzir a formação de nanopartículas. As proteínas foram produzidas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade, sem obstáculos quanto à toxicidade para a bactéria. A fluorescência das diferentes construções foi analisada e comparada. O comportamento hidrodinâmico das proteínas em solução foi também avaliado por DLS, com e sem a presença de pDNA, verificando-se assim interação com ácido nucleico e formação de nanopartículas. Estudos de atividade biológica em células *in vitro* indicam que a construção 1 foi capaz de direcionar e facilitar a entrada de siRNAs nas células que superexpressam receptores integrinas (células U87MG). Nos ensaios de citotoxicidade também foi demonstrado o potencial da própria proteína que, por si só, foi capaz de diminuir a viabilidade das células que superexpressam integrinas, sendo ela própria um potencial agente antitumoral.

Palavras-chave: Nanopartículas, proteínas recombinantes, terapia gênica, siRNA.

ABSTRACT

Advanced therapies such as gene therapy have been widely studied for the treatment of cancer. Many of these studies are based on the use of viral vectors for the delivery of nucleic acids to target cells. However, there are still recurring problems in these studies, such as; 1) the difficulty of gene delivery to tumor cells due to the presence of physical, enzymatic and diffusional barriers; 2) the stimulation of inflammatory response by the immune system due to the use of viral vectors and; 3) the high costs of producing these vectors. An alternative for overcoming these obstacles is the use of recombinant proteins specifically designed for gene delivery and combating tumor cells. These proteins are, in general, modular, multifunctional proteins capable of mimicking the ability of viruses to exploit extra- and intracellular signals and responses to infect cells. Thus, the main objective of this master's degree was the development and characterization of multifunctional recombinant proteins capable of efficiently carrying out the transport of genetic material (interfering RNA) into tumor cells. For this, the GFP reporter protein was fused to a disintegrin (Echistatin) serving as a targeting domain for tumor cells. The protein also contains a polyarginine (R6) that interacts and condenses the genetic material to be delivered. Four different gene constructs were synthesized and expressed in *Escherichia coli*: construct 1 – complete (H6-R6-GFP-ECH); construct 2 - without Echistatin (H6-R6-GFP); construct 3 - without the R6 sequence (H6-GFP-ECH); and construction 4 - (H6-R9-GFP-ECH), containing the R9 sequence with the potential to induce the formation of nanoparticles. The proteins were produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography, with no obstacles regarding toxicity to the bacteria. The fluorescence of the different constructs was analyzed and compared. The hydrodynamic behavior of the proteins in solution was also evaluated by DLS, with and without the presence of pDNA, thus verifying interaction with nucleic acid and formation of nanoparticles. Biological activity studies carried out *in vitro* indicate that construct 1 was able to direct and facilitate the entry of siRNAs into cancer cells that overexpress integrin receptors (U87MG cells). In the cytotoxicity tests, the potential of the protein itself was also demonstrated, which was capable of reducing the viability of cells that overexpress integrins, being itself a potential antitumor agent.

Keywords: Nanoparticles, recombinant proteins, gene therapy, siRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Testes clínicos com terapia gênica ao redor do mundo até 2021 e as principais doenças às quais as terapias são destinadas.	17
Figura 2 - Classificação Nacional do Câncer como causa de morte em idades menores que 70 anos em 2019.	18
Figura 3 - Número projetado de novos casos para todos os tipos de câncer analisados no estudo e combinados (ambos os sexos combinados) em 2040 de acordo com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 4 níveis.	20
Figura 4 - Passo a passo de como ocorre molecularmente, o mecanismo de interferência de RNA com siRNA em uma célula.	22
Figura 5 - Testes clínicos com terapia gênica ao redor do mundo até 2021.	24
Figura 6 - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA.	25
Figura 7 - Receptores integrinas e sua localização nos diversos tipos celulares.	28
Figura 8 - Funcionalização de nanocarreadores com sequência RGD.	30
Figura 9 - Ilustração da organização modular das 4 diferentes proteínas de fusão, cada cor representa um módulo que compõe as proteínas.	39
Figura 10 - Gel de agarose após digestão dupla do vetor já com os genes clonados da construção 1, utilizando as enzimas de restrição Xho I e Apa I	43
Figura 11 - Mapa do vetor pVAX1Luc, vetor este desenvolvido pela equipe de pesquisa a partir de um vetor comercial originalmente produzido pela PROMEGA (pVAX1).	46
Figura 12 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos plasmídeos dos clones 1 das construções 1 a 3.	53
Figura 13 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos plasmídeos dos clones 1 a 3, da construção 4.	54
Figura 14 – Tubos tipo Falcon contendo Pellet das bactérias que expressaram as construções de 1 a 3.	55
Figura 15 - Tubos tipo Falcon contendo as bactérias que expressaram as construções de 1 a 3, em solução pós sonicação	56
Figura 16 - Tubos contendo as bactérias que expressaram as proteínas de 1 a 4, em solução pós sonicação.	57
Figura 17 - Gel de SDS-PAGE comparando as proteínas antes e depois da dialise.	59
Figura 18 - Gel de SDS-PAGE comparando as proteínas antes e depois da dialise.	60

Figura 19 - Curvas comparativos da intensidade da fluorescência de cada uma das construções de proteínas modulares normalizados pela concentração total de cada proteína.	61
Figura 20 - Comparação da cinética de crescimento celular das bactérias E. coli portando as diferentes construções (C1 a C4).	63
Figura 21 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos clones 1 a 3, do plasmídeo repórter pVXA1Luc.	64
Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade com células Hela de cada uma das construções de proteínas modulares	71
Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade com células U87MG de cada uma das construções de proteínas modulares.	72
Figura 24 - Curva Dose-resposta do ensaio de citotoxicidade com células U87MG de cada uma das construções de proteínas modulares.	73
Figura 25 - Eficiência de silenciamento da expressão do gene da enzima repórter luciferase por meio dos complexos de cada proteína com siRNA funcional (C+GL3).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos das proteínas modulares.	40
Tabela 2 - Construções das proteínas modulares e seus componentes.	41
Tabela 3 - Sequências dos RNAs de interferência utilizados nos ensaios.	47
Tabela 4 - Quantificação de DNA plasmidial das construções das proteínas em diferentes mini-preparações.	54
Tabela 5 - Quantificação de DNA plasmidial em diferentes mini-preparações do plasmídeo repórter pVAX1Luc.	65
Tabela 6 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade do pDNA utilizado nas interações pDNA:proteína.	66
Tabela 7 - Diâmetro hidrodinâmico médio apresentado nanômetros e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 1) em diferentes razões mássicas.	67
Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 2) em diferentes razões mássicas.	68
Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 3) em diferentes razões mássicas.	69
Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 4) em diferentes razões mássicas.	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. A Terapia Gênica e a Nanomedicina.....	14
1.2. RNAs de interferência (iRNA) e seu potencial antitumoral	18
1.3. Vetores de Entrega Gênica.....	23
1.4. Direcionamento e Entrada na Célula.....	26
1.5. Proteínas Recombinantes Modulares e “Vírus Artificiais”	32
1.6. Potencial terapêutico das proteínas modulares no combate ao câncer.....	34
2. OBJETIVO	37
2.1. Objetivos gerais.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Transformação das bactérias e criação de biblioteca dos genes das proteínas.....	38
3.1.1. Desenho das proteínas modulares, síntese de genes e clonagem em vetor de expressão	38
3.2. Síntese e análise dos genes alvo em plasmídeo pET28a.....	41
3.2.1. Transformação das linhagens de E. coli Top 10 e E. coli BL21(DE3) Star	44
3.2.2. Cultivo de clones E.coli Top 10 (Biblioteca de clones).....	44
3.2.3. Mini preparação dos plasmídeos - Clones Top 10 (Biblioteca de plasmídeos).....	45
3.2.4. Obtenção de plasmídeo repórter pVAX1Luc	45
3.2.5. Eletroforese em gel de agarose	47
3.3. Expressão em E. coli e purificação das proteínas recombinantes	47
3.3.1. Expressão das proteínas recombinantes.....	47
3.3.2. Purificação das proteínas recombinantes	48
3.3.3. Eletroforese SDS-PAGE.....	49
3.4. Avaliação da influência da expressão no crescimento celular	50
3.5. Formação e caracterização dos complexos pDNA:proteína	50
3.6. Cultivo celular, banco e ensaios com células tumorais.....	51
3.6.1. Crescimento das células	51
3.6.2. Congelamento das células.....	51
3.6.3. Ensaios de citotoxicidade.....	51
3.6.4. Ensaio de transfecção.....	52

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. Transformação das bactérias, preparação dos bancos de células e mini preparação plasmidial	53
4.2. Ensaio de expressão das proteínas modulares	55
4.3. Purificação das proteínas recombinantes	58
4.4. Intensidade de fluorescência das construções	60
4.5. Avaliação da influência da expressão sobre o crescimento celular	62
4.6. Obtenção do plasmídeo repórter pVAX1Luc para os estudos de silenciamento	63
4.7. Diâmetro Hidrodinâmico Médio das Proteínas e Nanopartículas	65
4.8. Ensaio de citotoxicidade	70
4.9. Transfecção com siRNA para células U87MG	74
5. CONCLUSÃO.....	78
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Terapia Gênica e a Nanomedicina

Décadas atrás, em meados dos anos 1940, diversas descobertas foram feitas sobre a composição química, natureza e as propriedades do material genético. Dessa forma a genética foi fortemente impulsionada, e as primeiras manipulações do DNA de bactérias foram realizadas, criando-se a partir disso, grandes expectativas de novos avanços terapêuticos.

Cerca de 20 anos depois, já na década de 1960, surgiram especulações sobre a possibilidade de utilizar vírus para transferir genes a seres humanos portadores de doenças genéticas e assim curar essas pessoas (FRIEDMANN, 1997). Naquela época, considerava-se tanto que os próprios genes de determinados vírus pudessem fazer efeito, quanto que fosse possível inserir genes humanos em vírus, para que, posteriormente, esses os transferissem ao paciente. Porém, apenas na década seguinte foi possível manipular uma molécula de DNA, feito alcançado por Paul Berg (JACKSON et al., 1972), criando a tecnologia do DNA recombinante.

Contudo, foi somente em 1990 que uma equipe médica dos EUA obteve sucesso no tratamento de uma doença usando manipulação genética, após ter inserido um gene sadio no organismo de uma criança doente. A menina de quatro anos sofria de uma doença genética causada por deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA), fundamental para o desenvolvimento normal do sistema imune. Diversas mutações no gene que codifica a enzima são capazes de provocar deficiência de ADA, o que resulta em degeneração das células T do sistema imune (BUCKLEY, 2004) sendo uma das principais causas da Síndrome de Imunodeficiência Combinada Severa (SCID, do inglês: Severe Combined Immunodeficiency). Nesse caso, a doença é conhecida como SCID-ADA. Crianças afetadas pelas diversas formas de SCID quase não possuem resistência a infecções, e são conhecidas como “crianças bolhas” por necessitarem de isolamento, na maioria das vezes, feito por plástico transparente. Se não forem tratadas rapidamente ao descobrir a doença, morrem geralmente antes dos seis meses de idade.

A referida criança teve melhora significativa após o tratamento com manipulação genética, e assim começou uma nova era, a da terapia gênica (ou terapia genética), ou seja, um procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes sadios (ou "genes terapêuticos") para manipular de maneira a substituir ou suplementar genes inativos ou disfuncionais (LINDEN, 2008).

Atualmente a medicina moderna vem avançando fortemente e cada vez mais são feitas descobertas importantes em áreas de investigação que buscam o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças ainda incuráveis (como por exemplo muitos tipos de câncer, doenças hereditárias, entre outras), e com o uso cada vez maior de tecnologia. Existe hoje uma grande expectativa de curar doenças genéticas se utilizando de conhecimento e a identificação de genes responsáveis por sua patogênese e se apoiando no avanço das tecnologias de DNA recombinante (ou engenharia genética), tecnologias essas que permitem até um certo nível, a manipulação do genoma de forma eficiente e segura (WATSON et al., 2006).

A terapia gênica consiste no uso da engenharia genética e na consequente introdução de genes em células a sofrerem modificações. Entretanto, a entrada de material genético (DNA, RNA) puro através da membrana plasmática de células, principalmente eucarióticas, é um processo complexo e difícil de ocorrer (VELLAI & VIDA, 1999). Essa dificuldade é, natural e evolutivamente benéfica para o organismo em questão, pois dificulta alterações indesejadas e abruptas do metabolismo celular e até mesmo outras transformações de impacto maior observadas em grandes transições evolutivas. Consequentemente, há necessidade de um carreador que facilite a entrada do material genético nas células vivas. Esse veículo responsável por proteger e facilitar essa entrega é denominado "vetor". Há duas classes principais de vetores atualmente: vetores virais e vetores não virais. Um ponto importante para funcionalidade desses vetores é seu tamanho, que precisa ser em nanoescala. A área de estudo responsável pela compreensão e desenvolvimento dessas nanoestruturas que tem diversas aplicações além da terapia gênica, é a Nanomedicina.

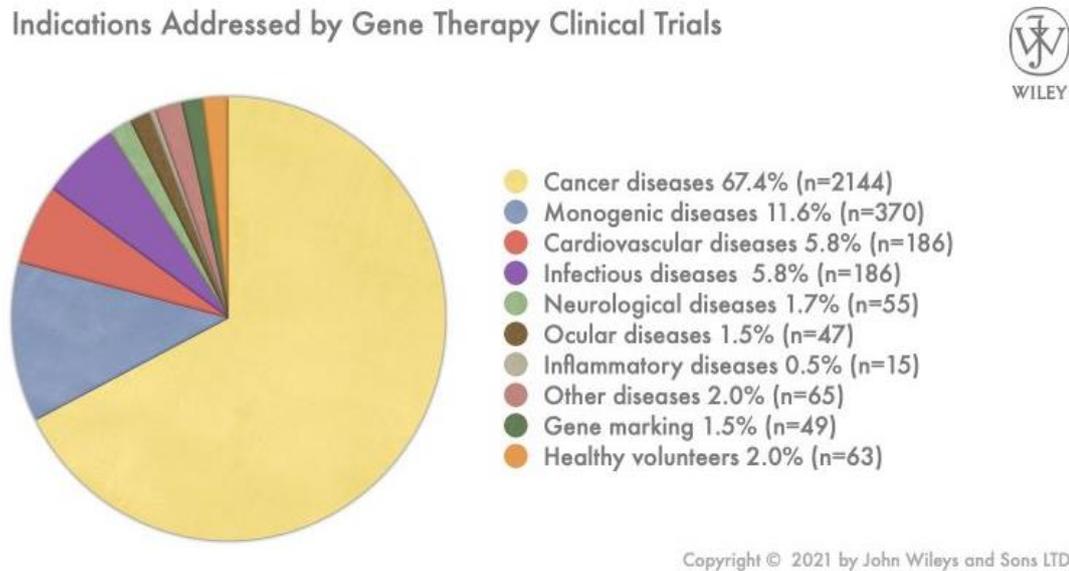
A Nanomedicina, como o próprio nome diz, é a junção da medicina e da nanotecnologia. Consiste em utilizar nanomateriais, nanopartículas, nanorobôs e outros elementos em escala nanométrica para prevenir, diagnosticar ou curar doenças. O advento da nanomedicina se deu com os avanços tecnológicos das últimas décadas (PEPIC et al., 2014; WIRTH et al., 2013). Quando são utilizados componentes biológicos como, por

exemplo, proteínas e lipídeos nas aplicações nanométricas, chamamos a área de estudo de nanobiotecnologia.

O avanço da nanobiotecnologia permitiu o desenvolvimento de nanomateriais e nanopartículas com características físico-químicas específicas tanto a nível celular, quanto a nível molecular, e que são biologicamente compatíveis (FANCIULLINO et al., 2013; HILL et al., 2016). Por meio de uma abordagem multi e interdisciplinar, é possível, atualmente, desenvolver fármacos com uma meia-vida maior, com melhor direcionamento, biodistribuição, menor citotoxicidade, portanto, mais biocompatíveis resultando em terapias potencialmente mais eficientes e menos tóxicas para o paciente do que as que utilizam fármacos convencionais (LI et al., 2012; WICKI et al., 2015).

Com o passar do tempo, além do advento das nanopartículas de diferentes materiais, surgiram também diferentes tecnologias de DNA recombinante e com a crescente gama de técnicas de manipulação genética, surgiu o interesse em aplicar este conhecimento na área da saúde por meio da inserção de moléculas de ácidos nucleicos em células. Os benefícios de uma terapia com ácidos nucleicos (pDNA, siRNA, miRNA etc), ou seja, terapia gênica, são amplos. Podendo ser a correção de um processo patológico de base genética com o silenciamento de um gene, o tratamento e contenção do avanço de uma doença, bem como o estímulo do sistema imune por genes exógenos (vacina de pDNA ou mRNA). Dessa forma a entrega gênica surge como uma estratégia de grande potencial na medicina, atualmente o câncer é a doença para qual existem mais estudos de terapia gênica (Figura 1). Como exemplo, o primeiro produto para terapia gênica foi aprovado em 2003 pela China, e consistia em um adenovírus modificado para o tratamento de alguns tipos de carcinoma.

Figura 1 - Testes clínicos com terapia gênica ao redor do mundo até 2021 e as principais doenças às quais as terapias são destinadas.



O gráfico demonstra a predominância dos testes clínicos voltados para estudos que visam o desenvolvimento de um tratamento direcionado ao câncer, sendo 67,4% dos estudos voltados a este fim. Fonte: The journal of Gene Medicine (2021).

Para que um tratamento seja considerado como terapia gênica, a European Medicines Agency (EMA) define que o produto final deve ter as seguintes características: (1) deve conter uma substância ativa que tenha ou consista em ácidos nucleicos recombinantes, administrado a seres humanos visando a adicionar, substituir, regular, ou deletar sequências gênicas; e (2) seu efeito terapêutico, profilático ou de diagnóstico, deve estar diretamente relacionado ao ácido nucleico que contém, ou ser produto da expressão de tal gene (KUTZLER e WEINER, 2008; LI et al., 2012; WIRTH et al., 2013). Como a história da aplicação da terapia gênica é recente, somente no ano de 2012, a EMA recomendou pela primeira vez a aprovação de um produto, o Glybera, baseado em um adenovírus modificado para tratar adultos com deficiência da lipoproteína lipase.

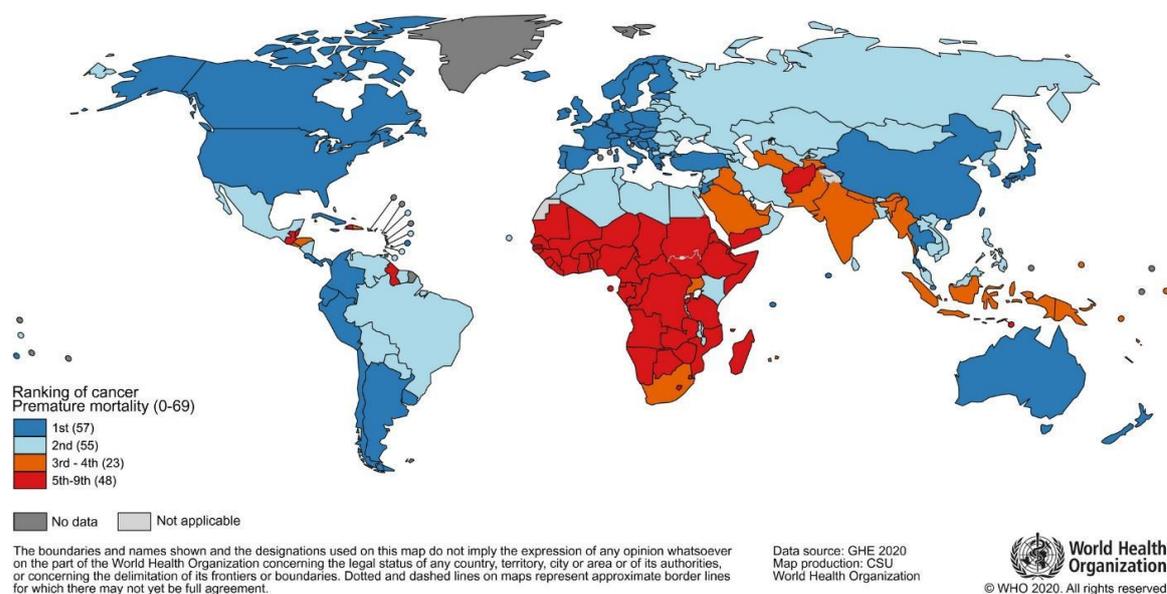
Inicialmente, a estratégia utilizada para terapia gênica consistia apenas na entrega de ácidos nucleicos do tipo DNA plasmidial (pDNA), e posteriormente a entrega de mRNA. Mas após a descoberta do RNA de interferência (RNAi) no final da década de 90, os RNAs

de dupla fita (dsRNAs) incorporaram o conjunto de abordagens disponíveis, promovendo principalmente o silenciamento de genes expressos de maneira indevida (GARY et al., 2007; KUTZLER e WEINER, 2008).

1.2. RNAs de interferência (iRNA) e seu potencial antitumoral

O câncer é uma doença multifatorial que atualmente é uma das principais causas de morte no mundo todo e uma grande barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo (BARY et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) em 2019, o câncer foi a primeira ou segunda principal causa de morte antes dos 70 anos na maioria dos países ao redor do mundo (em 112 de 183 países) e ocupa o terceiro ou quarto lugar em outros 23 países (Figura 2). A proeminência crescente do câncer como principal causa de morte reflete também, em parte, declínios acentuados nas taxas de mortalidade por doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral (AVC), em relação ao câncer, em muitos países, devido ao aumento da qualidade de vida.

Figura 2 - Classificação Nacional do Câncer como causa de morte em idades menores que 70 anos em 2019.



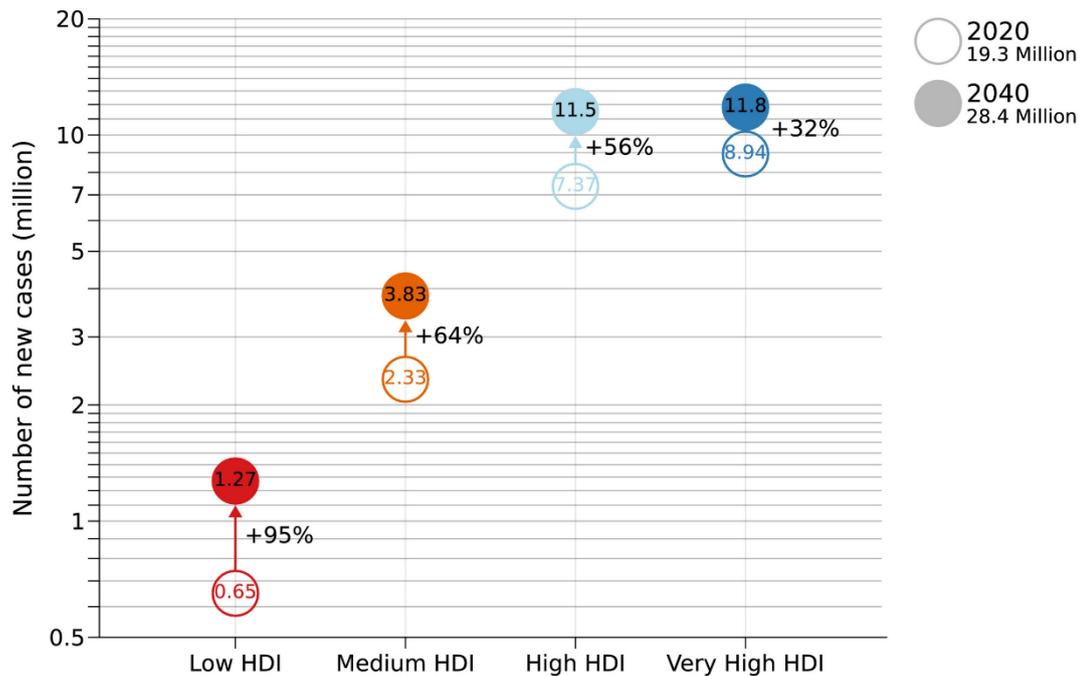
O número de países representados em cada grupo de classificação está incluído na legenda da imagem à esquerda. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2020).

A incidência da doença e mortalidade por câncer está crescendo rapidamente de modo geral no mundo todo; isso se deve tanto ao envelhecimento e o crescimento da população quanto às mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o câncer, muitos dos quais associados ao aumento no desenvolvimento socioeconômico.

Estimativas recentes (GLOBOCAN, 2020) indicam que houve 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10 milhões de mortes por câncer em 2020 a nível global. A doença tem se mostrado uma importante causa de morbidade e mortalidade em todas as regiões do mundo (OMRAN, 1971; GERSTEN E WILMOTH, 2002). Um ponto importante é que, na África, o risco cumulativo de morte por câncer entre as mulheres em 2020 é comparável aos riscos observados entre as mulheres na América do Norte e nos países de maior renda da Europa. Muitos países classificados com níveis de IDH baixo e médio estão experimentando um aumento acentuado na prevalência de fatores de risco de câncer conhecidos que prevalecem em países ocidentais de alta renda (por exemplo, tabagismo, dieta pouco saudável, sedentarismo e excesso de peso corporal). Portanto, embora a taxa de câncer aumente substancialmente em todos os níveis do IDH, a transição epidemiológica do câncer nos países emergentes provavelmente fará com que os mesmos sejam mais afetados no futuro (GERSTEN e WILMOTH, 2002; BRAY, 2014). Portanto, os esforços para construir uma infraestrutura sustentável para a disseminação de medidas comprovadas de prevenção do câncer e a prestação de cuidados contra o câncer em países em desenvolvimento são essenciais para o controle global da doença.

As estimativas futuras a nível mundial não são boas e a tendência é de que tenhamos cada vez mais casos de câncer. Estima-se que ocorram 28,4 milhões novos casos de câncer (exceto carcinoma basocelular) em 2040, o que representa um aumento de 47% em relação aos 19,3 milhões de casos correspondentes em 2020 (Figura 3). O aumento relativo é mais marcante nos países com IDH baixo (95%) e nos países com IDH médio (64%). Em termos de números absolutos, espera-se que os países com IDH elevado tenham o maior aumento da incidência, com 4,1 milhões de novos casos a mais em 2040 em comparação com 2020. Esta projeção deve-se exclusivamente ao crescimento e envelhecimento da população e pode ser ainda mais exacerbada por uma prevalência crescente de fatores de risco na maior parte dos países (GLOBOCAN, 2020).

Figura 3 - Número projetado de novos casos para todos os tipos de câncer analisados no estudo e combinados (ambos os sexos combinados) em 2040 de acordo com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 4 níveis.



Fonte: GLOBOCAN (2020).

O câncer possui uma diversidade extremamente elevada que oferece pistas sobre as causas subjacentes, mas principalmente reforça a necessidade de uma escalada global de esforços para controlar a doença. Pacotes de intervenções preventivas e curativas eficazes precisam estar disponíveis para o câncer, e sua integração personalizada no planejamento de saúde nacional pode servir para reduzir a taxa futura de câncer no mundo todo (GELBAND et al., 2016; WHO, 2017), ao mesmo tempo em que políticas para reduzir as evidentes desigualdades de câncer entre países subdesenvolvidos e os desenvolvidos são implementadas.

Existem diferentes abordagens clínicas para o tratamento do câncer, que muitas vezes são complementares entre si, pois cada uma utilizada sozinha não consegue fornecer uma resolução adequada dos casos. Após o diagnóstico da doença, o médico geralmente discute com o paciente as opções de tratamento, que dependerão do tipo e estágio do tumor, além da localização, estado de saúde geral do paciente e dos possíveis efeitos colaterais.

As abordagens clínicas mais comuns para o tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, quimioterapia, imunoterapia, transplante de medula óssea (a depender do tipo de câncer) e/ou a associação de alguma dessas terapias. O problema das abordagens atuais para o tratamento da doença é que elas em sua maioria podem ocasionar efeitos colaterais nocivos ao paciente, como toxicidade sistêmica, imunossupressão, danos psicológico, emocional e estético (PILLAI, 2019). A principal questão é que a maioria dos tratamentos não têm a seletividade necessária para afetar somente as células doentes, acabando por causar danos em células saudáveis, comprometendo a saúde do paciente e sua qualidade de vida. Olhando desse ponto de vista, a terapia gênica hoje amplamente estudada para o tratamento do câncer, surge como uma alternativa à essas abordagens, já que afetaria diretamente apenas os genes específicos responsáveis por causar a doença, que estão desregulados nas células, sem comprometer células saudáveis que não possuem alterações na expressão desses genes.

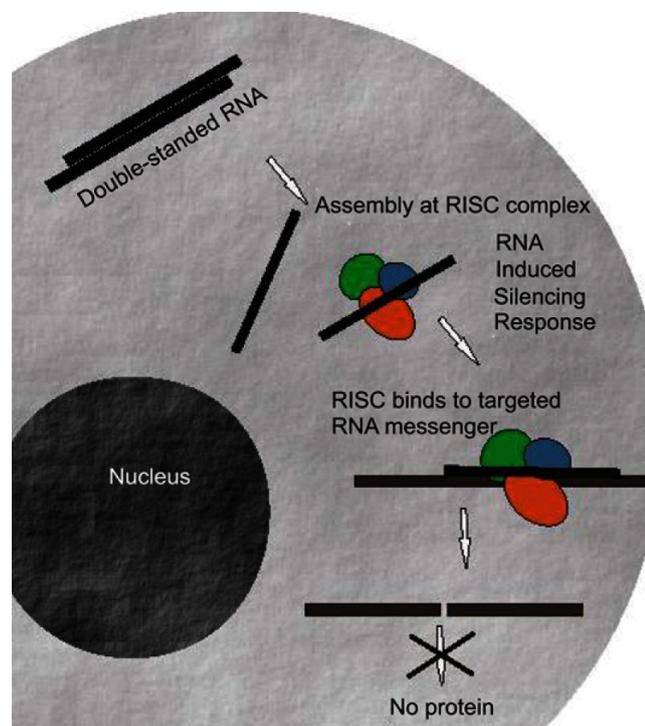
Quando falamos em terapia gênica para o tratamento do câncer, a maioria das abordagens estudadas visam a supressão, silenciamento e inibição da expressão de genes que sofreram mutações e passaram a ser nocivos levando ao câncer. Neste contexto, a ferramenta de RNA de Interferência (RNAi) é uma poderosa ferramenta para inibição de expressão gênica, que apresenta alta especificidade, e vem sendo utilizada e aprimorada para uso em célula de mamíferos há cerca de duas décadas (ELBASHIR et al., 2001). Ela utiliza um princípio de regulação pós transcricional que é muito conservado em eucariotos, sendo capaz de controlar a expressão de um gene em células vivas com base no uso de uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA), que é capaz de clivar o RNA mensageiro (RNAm) específico (BEREZIKOV, 2011; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; FIRE et al., 1998; ZHUANG; HUNTER, 2012).

As moléculas de dsRNA podem ser classificadas em três categorias: o miRNA (microRNA), que são pequenos dsRNA endógenos com cerca de 22 pares de base, siRNA (small interfering RNA), que consiste num duplex de RNA que tem entre 21 a 23 pares de base, e o shRNA (short hairpin RNA), que são sequências transcritas a partir de um vetor, ou também podem ser sintetizados exogenamente e introduzidos prontos nas células (MEISTER; TUSCHL, 2004).

O processo de RNAi ocorre no citosol da célula e se inicia quando o dsRNA é reconhecido por uma enzima chamada de Dicer (ribonuclease III) e então clivado em

sequências com 20 a 30 nucleotídeos. Logo em seguida, o complexo de silenciamento induzido por RNA, comumente chamado de complexo RISC (RNA-induced silencing complex), é formado através da agregação de várias proteínas especializadas, principalmente uma proteína da família Argonauta, que forma o sítio ativo do complexo. O complexo RISC, então, reconhece o dsRNA que o direciona para o RNAm complementar específico, se ligando a ele e o clivando (Figura 4). Dessa forma o complexo RISC é diretamente responsável pela degradação ou repressão do mRNA para qual o dsRNA é complementar, impedindo a expressão da proteína que esse RNA iria gerar, suprimindo e silenciando, portanto, a expressão do gene correspondente a essa sequência.

Figura 4 - Passo a passo de como ocorre molecularmente, o mecanismo de interferência de RNA com siRNA em uma célula.



Fonte: Mahmoodi et al. (2019).

Existem diversas vantagens do siRNA em relação a outras estratégias, dentre elas o fato de que essas pequenas moléculas podem ser projetadas e construídas rapidamente para

promover uma inibição específica para qualquer gene desejado, utilizando técnicas de biologia molecular. Além disso o uso de siRNA dispensa métodos de expressão celular, purificação de proteínas ou de refolding, tornando-o um mecanismo relativamente simples, além de ser um método de silenciamento gênico altamente eficiente devido a natureza catalítica do RNAi, onde uma mesma molécula de siRNA pode ser usada diversas vezes para guiar a clivagem de moléculas de mRNA (ELBASHIR et al., 2001; MEISTER; TUSCHL, 2004; REISCHL; ZIMMER, 2009; TSENG; MOZUMDAR; HUANG, 2009). Tendo isto em vista, a tecnologia do RNAi tem um vasto campo de aplicação na medicina e uma série de estudos promissores utilizando a tecnologia para combater células tumorais.

Apesar do potencial da entrega gênica, os ácidos nucléicos como os siRNAs não possuem especificidade, nem capacidade natural de entrar nas células, e são sensíveis e facilmente degradados por enzimas extra ou intracelulares, tornando-se necessário o uso de vetores que os entreguem. A administração de ácidos nucléicos exógenos é sempre um processo complexo, uma vez que os organismos vivos dispõem de barreiras naturais de proteção feitas para impedir que isso ocorra. Dessa forma, se faz extremamente necessário um vetor de entrega de ácidos nucléicos em nanoescala, visando proteger a molécula e superar as barreiras existentes. Neste contexto, dispõe-se atualmente de duas grandes classes de vetores: virais e não virais. A escolha de um vetor para entrega gênica tem de ser analisada principalmente em relação à sua eficiência de superação dessas barreiras e segurança proporcionada ao paciente.

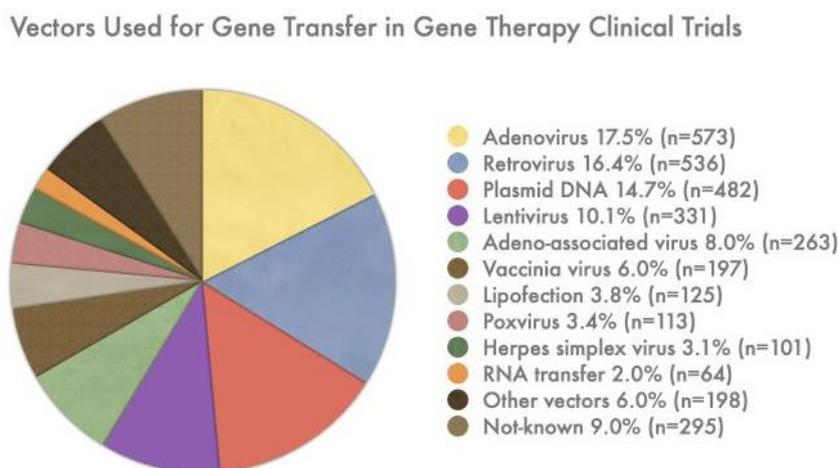
1.3. Vetores de Entrega Gênica

A seleção adequada do vetor é um aspecto crítico nos estudos de terapia e vacinação gênicas (COHEN et al., 2009; KHAN 2013; FAVARO et al., 2018a). Geralmente, os vetores são agrupados em duas categorias principais: virais e não virais. A escolha do vetor depende principalmente da doença que está sendo tratada, sua localização (qual tecido e tipo celular) e da intensidade da expressão do gene terapêutico que está sendo inserido nas células (AUDOUY et al., 2002). Nanomateriais não biológicos também podem ser utilizados. Apesar de inúmeras publicações, ensaios pré-clínicos e clínicos, apenas três tipos de nanopartículas receberam aprovações do FDA e do mercado europeu entre 2017 e 2020

(ANSELMO e MITAGOTRI, 2019). Isso porque existem diversos problemas associados a esse tipo de vetor principalmente relacionados à toxicidade e resposta inflamatória (DUAN et al., 2018; GUO et al., 2018).

A terapia gênica viral utiliza vírus modificados incompetentes de replicação para transferir material genético para células cancerígenas, para restaurar a expressão do gene supressor de tumores, reduzir a expressão de oncogenes ativos e/ou expressar genes suicidas. Demonstrou-se que as estratégias atuais são relativamente seguras em ensaios clínicos iniciais, mas até pouco tempo atrás geralmente mostravam baixo efeito terapêutico devido ao pequeno número de células cancerígenas infectadas e ao bloqueio do sistema imunológico (MCCORMICK, 2001). A Figura 5 demonstra que ainda atualmente os vetores virais são os mais frequentemente usados em estudos clínicos devido à sua alta eficiência, em comparação com outros tipos de vetores. Isso ocorre porque os vetores virais possuem características que permitem o reconhecimento celular mediado por receptores celulares específicos, a sua internalização, o escape de vesículas endossomais, o transporte ao longo de microtúbulos e a translocação nuclear. No entanto, a produção de vetores virais é complexa e dispendiosa, o que se torna uma barreira para a escala do processo. Além disso, eles também estão associados a reações imunológicas e inflamatórias graves em algumas ocasiões, o que os tornam também um risco à segurança dos pacientes (EDELSTEIN et al., 2007; SACCARDO et al., 2009; DÍAZ et al., 2018).

Figura 5 - Testes clínicos com terapia gênica ao redor do mundo até 2021.

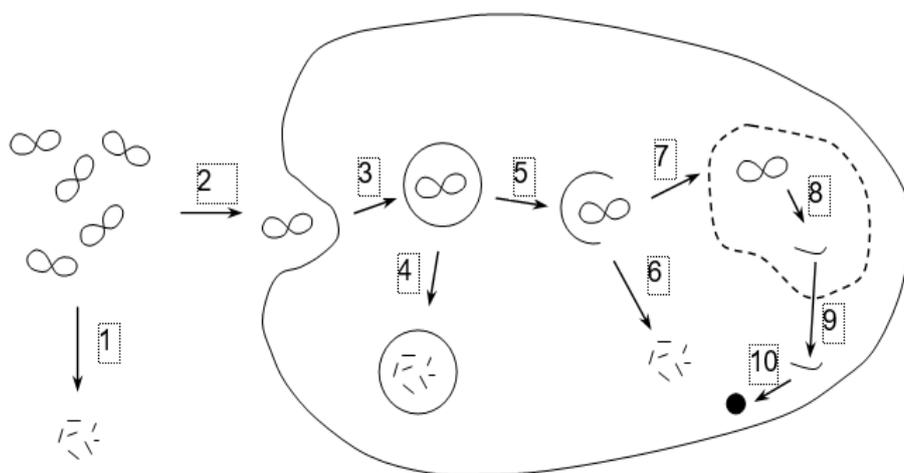


Copyright © 2021 by John Wiley and Sons LTD

A figura mostra os principais vetores utilizados nos estudos, demonstrando a predominância do uso de vetores virais como Adenovírus e Retrovírus. Fonte: The Journal of Gene Medicine (2021).

A Figura 6 ilustra que, embora os vetores não-virais sejam considerados mais seguros, eles geralmente são menos eficientes no transporte do material genético em comparação com os vetores virais. Isso ocorre devido à alta degradação por nucleases, dificuldade de direcionamento para o tecido (células alvo), baixa internalização e locomoção do pDNA no ambiente intracelular, bem como dificuldade em superar a barreira da membrana nuclear (RUPONEN et al. 2009; MOSQUERA et al., 2018; FOROOZANDEH e AZIZ, 2018). Esses vetores são compostos por dois elementos básicos: o conteúdo genético (DNA, mRNA, miRNA ou siRNA) e o constituinte de entrega. A principal vantagem desta classe de vetores é não estimular a imunidade e resposta inflamatória exacerbada. Além disso, eles possuem um custo muito inferior quando comparados aos vetores virais (JONES et al., 2014). Dessa maneira surge a necessidade do desenvolvimento de vetores que possam vencer as barreiras encontradas para entrega gênica mantendo os benefícios de um vetor viral, porém com a segurança necessária de um vetor não viral.

Figura 6 - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA.



Passo a passo das principais barreiras encontradas durante o tráfego de vetores para entrega gênica: (1) degradação por nucleases extracelulares; (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação no endossoma; (5) escape do endossoma; (6) degradação por nucleases citosólicas; (7) entrada no núcleo; (8) transcrição; (9) exportação do mRNA; (10) tradução. Fonte: Alves (2014).

1.4. Direcionamento e Entrada na Célula

Sabe-se que partículas sem moléculas de direcionamento ou receptores têm uma maior dificuldade para transporem as barreiras biológicas. Estratégias para aumento da eficácia da internalização de nanopartículas vêm sendo amplamente estudadas, os anticorpos possuem vantagens evidentes, incluindo sua alta afinidade e especificidade, estabilidade de longo prazo devido a múltiplas pontes dissulfeto inter e intra-cadeias. No entanto, a maioria das células não têm receptores específicos para os anticorpos que poderiam ser desenvolvidos, e sem receptores específicos se torna difícil a implementação ampla (GASTON et al., 2019; LU et al., 2020).

Para melhorar a eficiência de internalização de vetores ou nanocarreadores não-virais (nanopartículas), têm sido utilizados adjuvantes catiônicos que condensam e protegem o DNA, formando nanopartículas com características físico-químicas adequadas para interagir com a membrana celular. Esses adjuvantes incluem lipossomas catiônicos (AUDOUY et al., 2002; MAITANI et al. 2007, ROSADA et al., 2008), lipossomas fusogênicos sensíveis ao pH (YUBA et al. 2008), polímeros modificados de Polietilenoimina (NIMESH et al., 2007) e complexos de nanopartículas de ouro ou prata e pDNA (NOH et al., 2007; OW SULLIVAN et al., 2003). Além de facilitar a internalização, os complexos adjuvante-pDNA protegem o plasmídeo contra a degradação por nucleases (DE PAULA et al. 2007). Estudos mostram que essas estratégias têm melhorado significativamente a eficiência de entrega de material genético.

Nesse contexto, o uso combinado de um domínio catiônico na região N-terminal e uma região rica em histidina na região C-terminal de uma proteína principal (independentemente da origem e das sequências dos aminoácidos) resultou na geração de

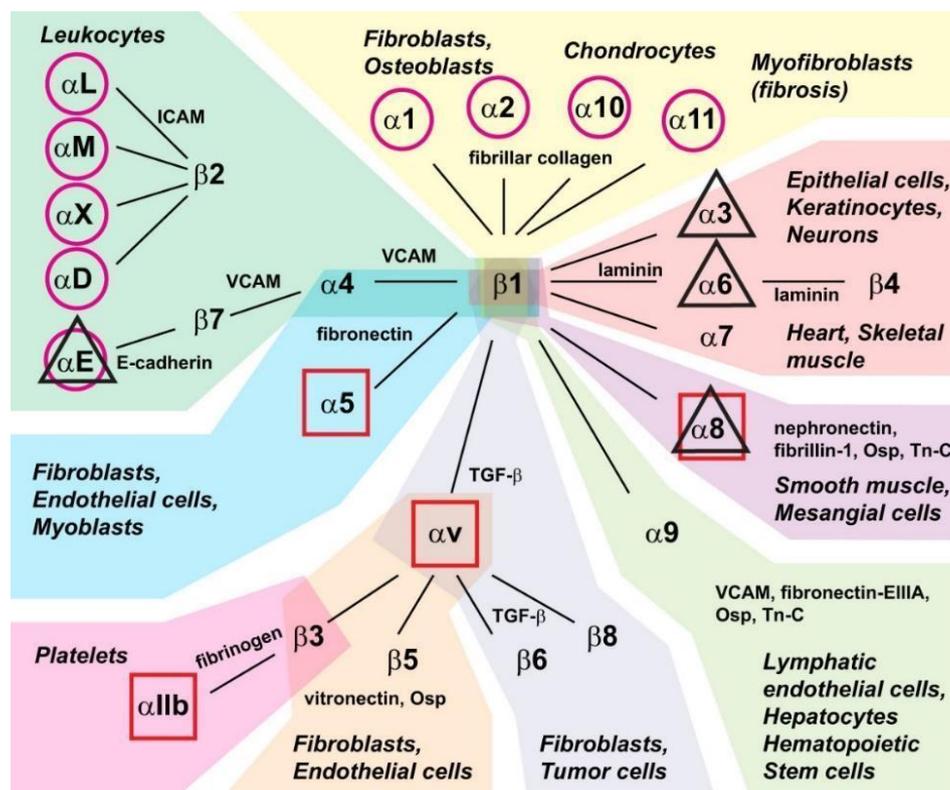
proteínas recombinantes, caracterizadas por serem nanopartículas cíclicas com tamanho variando de 12 a 100 nm (RUEDA et al., 2015).

Apesar do êxito em diversas aplicações em entrega gênica, os nanocarreadores podem apresentar baixa eficiência terapêutica devido à falta de direcionamento para receptores celulares presentes nas células alvo (CASANOVA et al., 2019; MOROZOVA et al., 2020). A interação entre nanopartículas e células é fundamental e, por isso, a modificação da superfície dessas nanopartículas por meio de abordagens bioquímicas ou químicas são estratégias interessantes para melhorar a internalização do pDNA pelas células-alvo, consequentemente minimizando os possíveis efeitos colaterais. Dentre as várias interações moleculares que podem facilitar o direcionamento da molécula de interesse, alguns estudos utilizaram peptídeos que se ligam a um conjunto de receptores de superfície celular, como as integrinas, em especial aquelas com a sequência RGD (arginina, glicina e aspartato).

A família das integrinas é composta de receptores heterodímeros transmembrana de duas subunidades α e β , e estão presentes em vários tipos de células. Já foram descritos cerca de 18 tipos de subunidades α e 8 tipos de subunidades β . Quando combinadas essas variedades de subunidades podem constituir ao menos 24 integrinas distintas que podem ser encontradas nas células de mamíferos (XIONG et al., 2001; GAGEN et al., 2013).

As integrinas podem ser classificadas de acordo com seus ligantes, sua expressão celular e tecidual, e também por suas características estruturais (Figura 7) (BACHMANN et al, 2019). Algumas são expressas constitutivamente e, portanto, produzidas em condições fisiológicas normais, e outras podem possuir regulação diferenciada e responderem a estados de ativação celular, por exemplo, na presença de citocinas angiogênicas (SILVA, 2007).

Figura 7 - Receptores integrinas e sua localização nos diversos tipos celulares.



Expressão celular e tecidual dos receptores integrinas, suas características estruturais e seus ligantes. Fonte: BACHMANN et al. (2019).

Devido à sua composição heterodimérica diversa, uma única integrina é capaz de se ligar a diversos ligantes distintos, assim como, diferentes integrinas podem se ligar ao mesmo ligante e ainda assim desencadear respostas diferentes ou as mesmas respostas. Por exemplo, ambas as integrinas $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha V \beta 6$, se ligam à fibronectina, mas ocasionam respostas diferentes (PAREJO, STUPP, RUEEG, 2019).

Os receptores integrinas agem como intermediadores na comunicação entre o citoesqueleto celular, proteínas plasmáticas e a matriz extracelular, através da adesão célula-a-célula por meio da interação com outras proteínas de membrana (BONET e HERNANDEZ, 2014). Dessa forma fornecem a interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, posicionamento, e migração celulares, além de induzir eventos sinalizadores que são necessários para a proliferação, sobrevivência, e diferenciação celular. Além disso, são reguladoras da angiogênese e da homeostasia vascular (SILVA et al., 2007).

As proteínas de adesão, embora estruturalmente distintas, requerem sequências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, normalmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das sequências de aminoácidos que contém ácido aspártico e são capazes de se ligarem às integrinas, a mais estudada delas é a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).

Por meio de sinalização advinda de fora da célula as integrinas transmitem sinais para o interior da célula através de seus domínios citoplasmáticos. Assim os domínios da subunidade β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares e nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular (XIONG et al., 2002; SILVA, 2007).

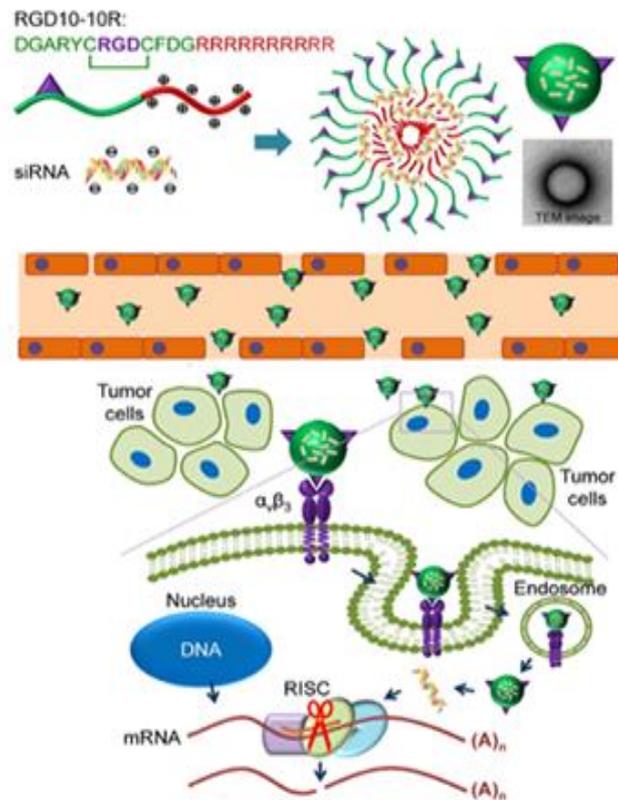
A integrina $\alpha_v\beta_3$ consiste em uma subunidade α_v de 125 kDa e uma subunidade β_3 de 105 kDa. Ela se liga a diversas moléculas da matriz extracelular com um motivo peptídico triplo Arg-Gly-Asp denominado: domínio RGD. As integrinas $\alpha_v\beta_3$ estão presentes em maiores quantidades em várias células tumorais (sendo superexpressas em osteossarcomas, neuroblastomas, carcinomas de pulmão, próstata, bexiga e mama; glioblastomas e melanomas invasivos), células endoteliais ativadas e vasos recém-formados que constituem vasos sanguíneos que nutrem o tumor, mas não em células endoteliais quiescentes, e são os receptores predominantes dos peptídeos RGD (HUANG et al., 2015), tornando-as um alvo adequado para a terapia anti-angiogênica do câncer e inibição da progressão tumoral. Quando um tumor se encontra em metástase, as integrinas agem como mediadoras na adesão de células tumorais à matriz extracelular e na degradação proteolítica da mesma por metaloproteases para a invasão tecidual, além disso, induzem a migração das células tumorais por meio da ativação da via PI3k / Akt (MONTENEGRO et al, 2012).

Uma terapia que também é anti-angiogênica é especialmente interessante para o controle da progressão da doença, pois na ausência de neovascularização suficiente para o transporte de nutrientes e, principalmente, de oxigênio, os tumores sólidos em geral tendem a não crescer mais do que de 1 a 2 mm (CHEN, NIU, CHEN, 2016).

Como os receptores de integrinas reconhecem o RGD como sequência primária (embora outras conformações possam modular a afinidade, como peptídeos cíclicos e lineares, por exemplo), a funcionalidade do RGD é geralmente mantida mesmo após etapas de processamentos que podem causar a sua desnaturação. Com a funcionalização dos

nanocarreadores com peptídeos RGD é possível que a entrega gênica seja sítio-específica (targeted delivery), resultando em transfecções *in vitro* e *in vivo* mais eficientes (Figura 8).

Figura 8 - Funcionalização de nanocarreadores com sequência RGD.



A sequência RGD presente no peptídeo catiônico visa a favorecer as interações com os receptores de superfície celular. Após se acumularem nos sítios específicos de tecidos tumorais, os complexos são internalizados pelas células por endocitose mediada pelos receptores $\alpha_v\beta_3$. Após a liberação do siRNA do endossoma/lisossoma, ocorre o silenciamento do gene de interesse e/ou a expressão da proteína de interesse. Fonte: Adaptado de HUANG et al., (2015).

Uma fonte de motivos RGD interessante são as desintegrinas. Elas são uma família de proteínas de baixo peso molecular de 4-15 kDa ricas em cisteínas isoladas de venenos de algumas espécies de serpentes pertencentes à família *Viperidae* que bloqueiam seletivamente as integrinas, atuando de maneira anti-metástase, anti-angiogênese, anti-proliferativa e indutora de apoptose (RIVAS-MERCADO e GARZA-OCANÃS, 2017). Elas são polipeptídeos resultantes de processamento proteolítico de precursores de

metaloproteinase e que carregam o motivo de reconhecimento das integrinas (RGD, KGD, WGD, VGD, MGD, RTS, KTS), sendo subdivididas em quatro grupos distintos. Muitas desintegrinas contêm a sequência do motivo RGD ou KGD que atua como um antagonista potente das integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ (MONTENEGRO et al, 2012).

A Echistatina é pertencente ao grupo de desintegrinas que tem moléculas com a característica de possuir de 41 a 51 aminoácidos estruturados em 4 pontes de cisteína. É uma potente antagonista da integrina $\alpha v\beta 3$. Foi descrita na década de 90 e isolada da serpente *Echis carinatus*. Também chamada de Echistatina – RGD, é uma molécula bem conhecida e estudada pelo grupo do Dr. Geraldo Santana Magalhães com o qual colaboramos. Esta molécula pode ligar-se especificamente às integrinas RGD dependentes (tais como $\alpha v\beta 3$ e $\alpha_{11b}\beta 3$) e bloquear a sua função (HUANG, 1998). Devido à elevada afinidade de ligação à integrina e a sua eficácia de inibição, as desintegrinas apresentam grande potencial como agente antitumoral devido aos seus efeitos anti-angiogênicos e anti-metastáticos, como demonstrado em vários modelos experimentais (HUANG et al., 2001; SWENSON et al., 2004; MCLANE et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2019).

Estudos têm investigado o uso de peptídeos membranoativos, com alta concentração de arginina e lisina, como uma alternativa para promover a entrega gênica (FERRER-MIRALLES et al., 2008). Assim como lipídeos e polímeros, a natureza catiônica desses peptídeos permite a condensação e proteção do material genético. O TAT do vírus HIV e o peptídeo penetratina são exemplos de peptídeos com alto potencial de entrega gênica (MOSCHOS et al., 2007; FAVARO et al., 2014). O TAT é um peptídeo de 11 aminoácidos que é capaz de transportar moléculas através de membranas plasmáticas e nucleares (NITIN et al., 2009), enquanto a penetratina é um peptídeo anfifílico com resíduos de arginina e lisina que interagem com e condensam o DNA, além de facilitarem a transposição de membranas, promovendo a internalização e o escape das vesículas endossomais. Esses peptídeos catiônicos associados ao direcionamento mediado por receptores específicos montam uma boa estratégia para entrega eficiente de material genético.

Para criar partículas toroidais que possam penetrar em células de mamíferos, é necessário usar uma sequência de aminoácidos positivos, especialmente argininas, de pelo menos 6 a 10 resíduos. A entrada de vetores não-virais nas células pode ocorrer por meio de diferentes formas, incluindo endocitose mediada por clatrina, cavéola ou macropinocitose, que dependem principalmente do tamanho do vetor. Ainda não está muito claro como o tipo

de entrada afeta a rota intracelular do vetor e a qualidade da transfecção. No entanto, é sabido que o mesmo vetor pode ser internalizado por diferentes rotas, que geralmente levam aos endossomas tardios e lisossomas, demonstrando a importância do escape endossomal para uma transfecção eficiente. (RUDOLPH et al., 2003; FERRER-MIRALLES et al., 2008; CASANOVA et al., 2019; ALVES et al., 2017; FLORCZAK et al., 2019).

1.5. Proteínas Recombinantes Modulares e “Vírus Artificiais”

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos que se ligam formando longas cadeias, sendo essenciais para a vida. Na atualidade com o desenvolvimento da tecnologia, são exploradas também em versões recombinantes, como medicamentos, componentes de vacinas, entre outros usos na biomedicina e indústria farmacêutica. Na área de oncologia, já existem proteínas individuais ou complexos supramoleculares adaptados como portadores de medicamentos de pequeno peso molecular para entrega direcionada à células tumorais, por meio de veículos apropriados para manter a estabilidade de medicamentos ou para a geração de construções com diferentes propriedades que mimetizam entidades naturais capazes de entrar em células, como os vírus.

Ainda hoje, vetores virais utilizados para entregas direcionadas são considerados pouco seguros, sendo que vetores não-virais, como as proteínas, são geralmente pouco eficientes. Foi desenvolvido então o conceito do que chamamos de "vírus artificial", que seria uma nanopartícula que combina a segurança dos vetores não-virais com a eficácia dos vetores virais. Isso pode ser alcançado através da adição de: (I) ligantes de diferentes tipos que direcionam e facilitam a entrada dos vetores nas células, (II) peptídeos fusogênicos (prevenindo a degradação endossomal), e (III) sinais de localização nuclear que tornam a entrada no núcleo mais eficiente, que combinados com o pDNA mimetizam os vírus reais (MÜLLER et al., 2001; MASTROBATTISTA et al., 2006; CASANOVA et al., 2019).

A maioria das proteínas terapêuticas são substitutos de enzimas endógenas ou hormônios que estão naturalmente presentes no corpo do paciente, e também são exploradas como auxiliadoras de medicamentos convencionais de pequeno peso molecular. No entanto, as proteínas também podem ser utilizadas para auxiliar na entrega de ácidos nucleicos, para conferir estabilidade, tamanho em nanoescala e capacidade de penetração celular ou

direcionamento específico, dos quais os medicamentos convencionais geralmente são desprovidos. A entrega de medicamentos direcionados à células é especificamente exigida no caso de agentes citotóxicos (principalmente os usados em oncologia), uma vez que sua falta de seletividade causa efeitos colaterais graves, por afetar também as células saudáveis do paciente (MANGUES e VILLAVERDE, 2016).

O grupo de pesquisa liderado pelo Professor Antônio Villaverde, da Universidade Autônoma de Barcelona é pioneiro no desenvolvimento de vetores formados por proteínas recombinantes capazes de se auto-montarem na forma de nanopartículas multifuncionais (VAZQUEZ e FERRER-MIRALLES, 2009; UNZUETA et al., 2015; DÍAZ et al., 2018). Podemos considerar as proteínas como as moléculas mais adequadas para imitar os vírus quando pensamos em terapia gênica. Já que são responsáveis pelas funções biológicas, proporcionam especificidade às interações moleculares e são biocompatíveis, além de altamente versáteis (CORCHERO et al., 2014; UNZUETA et al., 2015).

Uma vez que são muitos os obstáculos à entrega e as proteínas são, por sua vez, passíveis de serem combinadas para facilitar diferentes etapas da entrega gênica, surgiu o conceito de proteínas modulares, que incorporam diferentes funções, sendo uma estratégia altamente promissora e versátil para a criação de vetores de entrega de genes e drogas (UNZUETA et al., 2015). Diversas abordagens foram exploradas para produzir proteínas como blocos de construção de entidades supramoleculares complexas, capazes de realizar automontagem/complexação. Isso pode ser alcançado projetando-se *de novo* princípios moleculares ou explorando os domínios de oligomerização naturais (FERRER-MIRALLES et al., 2015) promovendo assim interações proteína-proteína necessárias para construir, por exemplo, gaiolas de proteínas e estruturas cíclicas, entre outras (YEATES, 2017; YEATES e LIU, 2016; BOYKEN et al., 2016; FALLAS et al., 2017).

O método para formação das proteínas em módulos também conhecidos como “building blocks”, pode ser utilizado em células procariontas como a *E.coli*, ou em células eucarióticas. Isso permite a produção de nanopartículas eficientes a um custo mais acessível e de maneira conhecida pela indústria, tornando o processo mais escalável (VAZQUEZ e VILLAVERDE, 2010).

Através de avanços em biologia molecular e sintética, o número de proteínas disponíveis para uso na entrega gênica aumentou significativamente. Peptídeos podem ser projetados por bioinformática ou redesenhados, podendo ser combinados em módulos para

atender objetivos específicos. As proteínas modulares são particularmente promissoras no campo de terapias contra o câncer (VAZQUES et al., 2010; DÍAZ et al., 2018; FAVARO et al., 2018c).

A aplicação de nanopartículas proteicas para a entrega de drogas, por exemplo, representa a possibilidade de utilizar um sistema ideal, que alia biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (DÍAZ et al., 2018; MOROZOVA et al., 2020). Além disso, os nanomateriais baseados em proteínas se beneficiam da fácil fabricação biológica e da capacidade de recrutar uma diversidade de funções relevantes para a administração de medicamentos, como auto-montagem, direcionamento celular, escape endossômico e transporte nuclear em seus blocos de construção (VAZQUEZ et al., 2016). Dessa forma as nanopartículas proteicas são atraentes como imitadores de vírus para administração intracelular de drogas (UNZUETA et al., 2015), e são especialmente promissoras por poderem ser modificadas para agir como vetores de entrega gênica, de drogas, ou para atuarem elas próprias como drogas, sendo extremamente versáteis (DÍAZ et al., 2018).

Porém, mesmo com a grande potencialidade de aplicações, o emprego terapêutico de nanopartículas baseadas em proteínas ainda apresenta desafios importantes a serem superados. Há ainda dois desafios cruciais na área de entrega gênica que necessitam de maior atenção: a capacidade de direcionamento para células específicas e a estabilidade das nanopartículas em ambientes biológicos (FERRER-MIRALLES et al., 2008; FAVARO et al., 2018b). É essencial obter uma melhor compreensão do papel das diferentes moléculas e domínios utilizados. No entanto, a falta de estudos sistemáticos e comparativos têm dificultado essa compreensão (FERRER-MIRALLES et al., 2008; ALVES et al., 2017; SÁNCHEZ-GARCÍA et al., 2018; MOROZOVA et al., 2020).

1.6. Potencial terapêutico das proteínas modulares no combate ao câncer

Recentemente, diversos estudos utilizando proteínas encontradas na natureza para fins terapêuticos foram desenvolvidos, direcionando os esforços a buscar oportunidades e entender mecanismos visando a aplicação médica ao invés do foco na síntese de drogas químicas. Algumas dessas moléculas incluem, por exemplo, toxinas individuais e componentes de veneno, fatores pró-apoptóticos, antitrombóticos, fibrinolíticos,

neuromoduladores e peptídeos antimicrobianos de bactérias, animais e plantas, podendo algumas inclusive auxiliar no tratamento do câncer (CHAIKUL et al., 2016, CALDERON et al., 2013).

Dessa forma, embora toxinas possam parecer apenas prejudiciais para nós enquanto seres humanos, elas podem também contribuir para o desenvolvimento de drogas. Como alternativa inovadora, proteínas citotóxicas identificadas na natureza podem ser adaptadas e transformadas de forma precisa em agentes terapêuticos por meio da engenharia de proteína, sendo projetadas como drogas altamente potentes. Um exemplo da exploração bem-sucedida da aplicação dessas toxinas como agentes terapêuticos se deu com estudo do grupo do Dr. Geraldo do Instituto Butantan (SIQUEIRA et al., 2019), onde foi mostrada a construção de uma toxina híbrida, chamada Rechistatina, composta por duas classes diferentes de toxinas de dois animais peçonhentos. A construção foi composta pelo PLD (fosfolipase D) LgRec1 da aranha *L.gaúcha* e pela desintegrina Echistatina da serpente *Echis carinatus*, a mesma estudada nesta dissertação. Esse estudo demonstrou que a porção desintegrina da Echistatina presente na Rechistatin foi eficaz para impedir a agregação indesejável de plaquetas promovida pela porção LgRec1. Além disso, a desintegrina foi capaz de entregar a LRec1 às células de melanoma murino B16F10. Ligando-se à essas células, a Rechistatin mostrou um efeito de citotoxicidade sinérgica em concentrações mais baixas, indicando que essa toxina híbrida pode representar uma ferramenta interessante para explorar o potencial das fosfolipases D da aranha contra células tumorais com alta expressão de receptores integrina.

Em adição às atividades citotóxicas intrínsecas dessas moléculas, sua fabricação por tecnologia de DNA recombinante permite o recrutamento, em entidades farmacológicas únicas, de diversas funções de interesse clínico, como receptores específicos de superfície celular, autoativação e automontagem como materiais nanoparticulados, tendo uma ampla aplicabilidade em oncoterapia e terapia dirigida a células (SERNA et al., 2018).

Com a participação de nosso grupo de pesquisa, estratégias de engenharia de proteína resultaram em uma proteína capaz de superar um problema comum existente no desenvolvimento de moléculas terapêuticas, que é a internalização (FAVARO et al., 2018). Utilizando poliargininas como ilhas CCP (peptídeo de penetração celular), e a GFP como base estabilizadora da proteína, a molécula ainda demonstrou direcionamento para células

com expressão de receptores CXCR4 um marcador tumoral superexpresso em vários cânceres humanos, demonstrando dessa forma a aplicabilidade das proteínas modulares.

Por fim, a possibilidade de combinar um domínio de direcionamento celular e uma proteína citotóxica em um único produto (molécula) é a base para pesquisas em andamento em muitas áreas clínicas, especialmente na oncologia. As drogas baseadas em proteínas têm ainda a grande vantagem da versatilidade estrutural e da funcionalidade ampla dos polipeptídeos naturais, cujas atividades cobrem a maioria dos eventos biológicos, sendo um grande potencial para aplicação em oncoterapia (VOLTÀ-DURAN et al., 2022). É neste sentido que se encaixa esta dissertação de mestrado; ampliar o conhecimento disponível atualmente sobre o uso de proteínas modulares baseadas em domínios de direcionamento, e também capazes de transportar moléculas de ácidos nucleicos tendo em vista o desenvolvimento de novas estratégias de combate às células tumorais.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos gerais

Desenvolvimento de novas proteínas modulares recombinantes para atuar como vetores de entrega de genes e combate às células tumorais. Dessa forma, espera-se contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos de direcionamento e entrada de transgenes em células tumorais, especialmente no que diz respeito ao uso de proteínas recombinantes especificamente desenhadas para esse fim.

2.2. Objetivos específicos

- Clonagem, expressão em *E. coli*, e purificação de proteínas recombinantes para atuarem como transportadoras, baseadas na proteína repórter GFP (proteína verde fluorescente), contendo também a sequência Echistatina de direcionamento para células tumorais que superexpressam Integrinas $\alpha\beta3$, além de domínios de ligação à ácidos nucleicos (R6 ou R9);
- Caracterização das proteínas de fusão e da interação destas com material genético, além da avaliação das características físico-químicas dos complexos formados;
- Ensaios *in vitro* de transfecção em células de mamíferos (linhagens tumorais) visando a avaliar a citotoxicidade das diferentes construções e a capacidade de entrega de siRNA para as células cultivadas *in vitro*, por meio de interação com receptores integrina. A eficiência de entrega para as células foi avaliada através da supressão da expressão do gene repórter Luciferase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

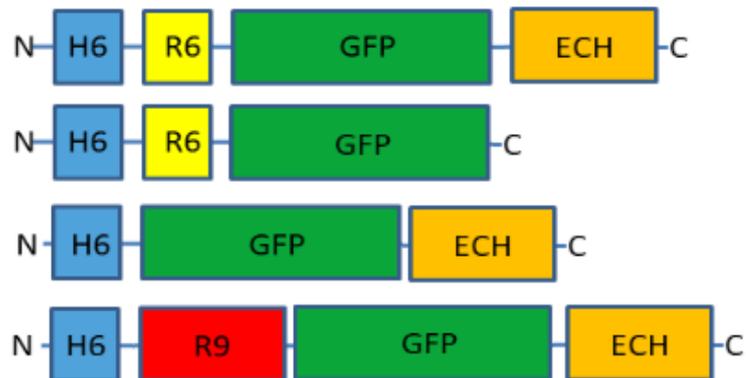
3.1. Transformação das bactérias e criação de biblioteca dos genes das proteínas

3.1.1. Desenho das proteínas modulares, síntese de genes e clonagem em vetor de expressão

Na proteína modular proposta, a proteína repórter GFP (proteína verde fluorescente) está no centro da construção da proteína modular (Figura 8). No N-terminal, a proteína contém uma seqüência de seis histidinas com a finalidade de proporcionar facilidade de purificação e facilidade de escape endossomal (LÓPEZ-LAGUNA et al., 2019), além de uma seqüência de interação com ácidos nucleicos contendo seis argininas (R6). Finalmente, em C-terminal a proteína modular contará com a seqüência Echistatina (peptídeos RGD) de direcionamento para células tumorais que superexpressam Integrinas (LIMA-DOS-SANTOS et al., 2015). Essa construção deve ser capaz de entregar eficientemente os ácidos nucleicos às células tumorais e ser citotóxica para essas células em algum nível devido à presença de Echistatina na construção.

Foram construídas ainda outras duas variantes desta proteína (construção 2 e 3) de forma a atuarem como controles para a avaliação das diferentes capacidades da proteína modular (direcionamento e interação com a carga, respectivamente), e uma construção com um módulo de nove argininas (R9) ao invés de seis, devido a sua capacidade de levar à formação de nanopartículas quando utilizada em proteína modulares (FAVARO et al., 2018c). As construções modulares podem ser observadas na Figura 9.

Figura 9 - Ilustração da organização modular das 4 diferentes proteínas de fusão, cada cor representa um módulo que compõe as proteínas.



O módulo “H6” corresponde à sequência de histidinas, necessária para a purificação simplificada das proteínas; “R6” ou “R9” corresponde à sequência de interação com o siRNA (FAVARO et al., 2018b); “GFP” corresponde à proteína verde fluorescente, com a função de garantir a estabilidade da proteína em solução e também como repórter de entrada e tráfego intracelular do vetor; “ECH” corresponde ao domínio de direcionamento para células tumorais Echistatina. O “linker (GGGNS) estará presente separando os módulos (FAVARO et al., 2018c). Fonte: Autor.

As sequências dos aminoácidos de cada uma das proteínas que compõe a nanopartícula foram selecionadas, avaliadas e convertidas nas sequências de nucleotídeos correspondentes.

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos das proteínas modulares.

Nome	Sequência de aminoácidos correspondente
Cauda de histidina - H6	HHHHHH
Proteína verde fluorescente - GFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGH KFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGK LPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHM KQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE DGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNE KRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK
Echistatina - ECH	ECESGPCCRNCKFRGDGTICKRARGDD LDDYCNGKTCDCPRNPHKGPAT
Poliarginina - R6	RARGRGRRR
Poliarginina – R9	RRRRRRRRR
Sequência de ligação entre as proteínas modulares - Linker	GGGNS

Para facilitar a organização durante os ensaios, identificamos as proteínas modulares da seguinte forma:

Tabela 2 - Construções das proteínas modulares e seus componentes.

Construção 1	H6-LINKER-R6-LINKER-GFP-LINKER-ECHISTATINA
Construção 2	H6-LINKER-R6-LINKER-GFP
Construção 3	H6-LINKER-GFP-LINKER-ECHISTATINA
Construção 4	H6-LINKER-R9-LINKER-GFP-LINKER-ECHISTATINA

Foi solicitada a síntese dos genes das construções modulares já inseridas em vetor de expressão pET28a, que é um vetor plasmidial específico para expressão em bactérias da Merck, EUA. A síntese foi feita pela empresa Biomatik, EUA, através do intermediário da empresa FastBio, Brasil. Os genes foram fornecidos com laudo de sequenciamento, atestando a integridade da sequência encomendada. Primeiramente foram encomendadas as construções 1 a 3 e posteriormente a construção 4.

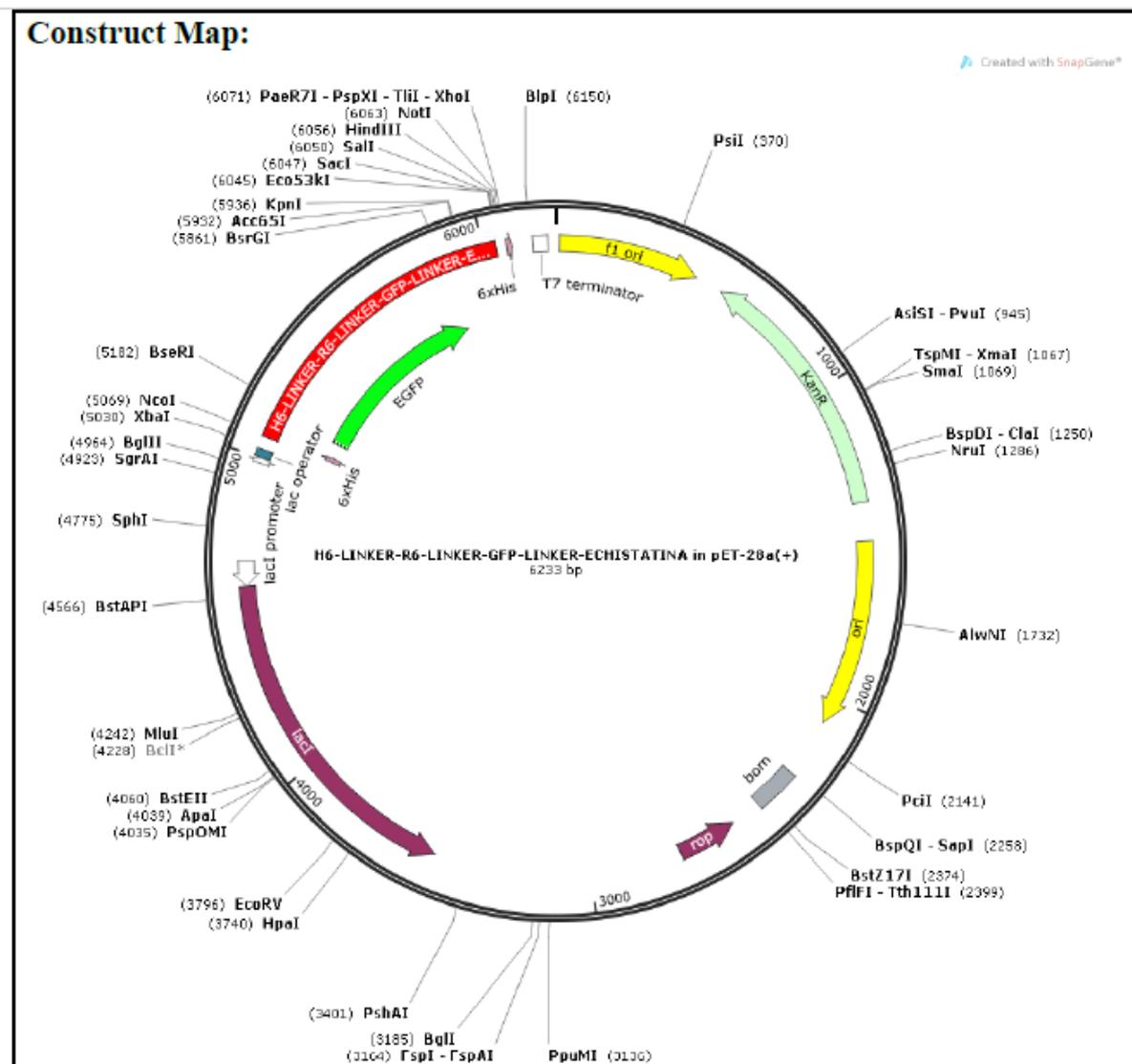
3.2. Síntese e análise dos genes alvo em plasmídeo pET28a

Como descrito anteriormente, os genes foram desenhados por nós de forma a expressarem proteínas recombinantes modulares segundo apresentado na Figura 8. A princípio, as construções 1 a 3 foram primeiramente encomendadas, sendo sintetizadas e inseridas em plasmídeo pET28a. Como pode-se observar, as construções 2 e 3 são variações de controle para que possamos melhor compreender o desempenho biológico da construção 1, esta sim a construção completa. Espera-se que esta proteína seja capaz de direcionar, preferencialmente, ácidos nucleicos (em especial siRNA) para células tumorais, com a função de levar estas células à apoptose. A citotoxicidade da proteína também será avaliada.

Após o desenho das construções e encomenda realizadas por nós, a empresa responsável pela síntese e clonagem dos genes no vetor de expressão pET28a fez a verificação do êxito da síntese por sequenciamento e análise de restrição em gel de agarose.

Pode-se observar que a síntese e clonagem correspondem às construções solicitadas. O resultado e o mapeamento do vetor da construção 1 pode ser visto na imagem abaixo (Figuras 10). Todas as outras três construções seguem o mesmo mapa, sendo as sequências das proteínas inseridas entre os mesmos locais de restrição das enzimas descritas no mapa. O tamanho das outras construções é, proteína 2: 6,00 kpb; proteína 3: 6,19 kpb; e proteína 4: 6,23 kpb.

Figura 10 - Gel de agarose após digestão dupla do vetor já com os genes clonados da construção 1, utilizando as enzimas de restrição Xho I e Apa I



Exemplo de Mapa do vetor clonado contendo o gene da proteína modular: construção 1. Fonte: Biomatik.

3.2.1. Transformação das linhagens de *E. coli* Top 10 e *E. coli* BL21(DE3) Star

Duas linhagens diferentes de bactérias quimicamente competentes foram utilizadas: Top 10 (*E. coli* utilizada apenas para clonagem de plasmídeo) e BL21(DE3) Star, utilizada para expressão de proteínas. As bactérias foram descongeladas em banho de gelo e incubadas no mesmo por 5 minutos. O volume de 3 μ L de DNA plasmidial (pDNA) foi adicionado a 100 μ L de células e essa suspensão foi incubada em banho de gelo por 20 minutos. A suspensão de células + pDNA foi então incubada em banho quente a 42°C por 45 segundos, e então novamente submetida a banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, 700 μ L de meio LB foram adicionados à suspensão de células e pDNA que foi, então, incubada a 37°C durante 1 hora. Os frascos Eppendorfs passaram por uma centrifugação de 2 minutos a 6000 rpm, sendo 500 μ L de sobrenadante retirados de cada tubo e os pellets celulares ressuspendidos. Posteriormente efetuou-se o plaqueamento com volume 80 μ L em cada placa, em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo o antibiótico canamicina na concentração final de 30 μ g/mL. As placas foram então incubadas overnight a 37°C.

3.2.2. Cultivo de clones *E. coli* Top 10 (Biblioteca de clones)

A partir do surgimento de colônias nas placas, foram selecionados 5 clones isoladamente de cada construção das proteínas modulares (1, 2 e 3). Cada colônia selecionada foi adicionada a seu respectivo tubo tipo Falcon (totalizando 15 tubos) de 50 mL contendo 12 mL de meio LB e 12 μ L de antibiótico canamicina (30 μ g/ μ L). Os tubos foram incubados overnight em um shaker a 200 rpm e temperatura de 37°C.

No dia seguinte 700 μ L de cada clone foi aliquoteado em seu respectivo tubo Eppendorf e em seguida foram adicionados 300 μ L de uma solução de glicerol 50%. Os tubos foram então armazenados em ultra-freezer, a -80°C. O mesmo procedimento foi realizado para construção 4 posteriormente, já que a mesma foi encomendada somente após os ensaios preliminares das construções 1 a 3 (porém com apenas 3 clones).

3.2.3. Mini preparação dos plasmídeos - Clones Top 10 (Biblioteca de plasmídeos)

Uma alíquota de 50 µL de cada clone armazenado (15 no total) foi adicionada ao seu respectivo tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 13 mL de meio LB e 13 µL de canamicina (30 µg/µL). Os tubos foram colocados em agitação a 37°C e 200 rpm e as células foram cultivadas overnight. No dia seguinte 3 mL de cada uma das culturas foram retirados dos tubos e prosseguiu-se com o protocolo de extração de DNA plasmidial do Kit Illustra PlasmidPrep Mini Spin kit, da Invitrogen, EUA, segundo as instruções do fabricante. Ao fim do protocolo, as soluções contendo os 15 plasmídeos purificados foram quantificadas por espectrometria a 260 nm e posteriormente foram armazenadas a -20°C.

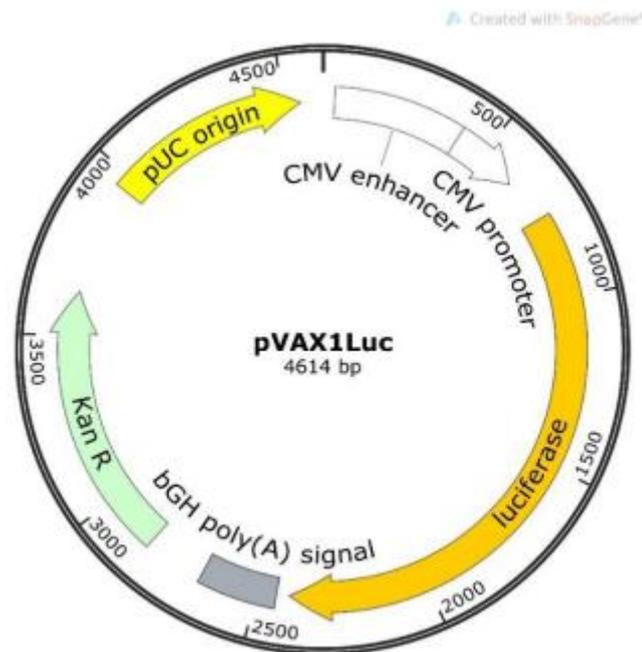
3.2.4. Obtenção de plasmídeo repórter pVAX1Luc

Para análise do potencial de entrega e silenciamento gênico pelos complexos binários proteína:siRNA nos ensaios de transfecção celular, as células tumorais receberão previamente o plasmídeo pVAX1Luc (Figura 11), que contém o gene repórter da Luciferase. Esse plasmídeo tem 4,6 kpb e foi desenvolvido especificamente para utilização em vacinação gênica. Originalmente continha a sequência codificadora da GFP (*Green Fluorescent Protein*) sendo chamado de pVAX1GFP. No pVAX1Luc a sequência da GFP foi substituída pela sequência codificadora da Luciferase (AZZONI et al., 2007) obtida do plasmídeo pGLP3-control (Promega).

As células tumorais foram transfectadas com esse plasmídeo e então posteriormente analisaremos a entrega dos siRNA pelas proteínas para essas células por meio do silenciamento do gene da repórter da luciferase, efetuado pelo siRNA.

O plasmídeo pVAX1Luc foi obtido após a purificação bem-sucedida das 4 construções das proteínas. Foi transformado em linhagens de *E. coli* Top 10 sendo selecionados 3 clones diferentes. Foi adicionado glicerol à alíquota de cada um dos clones e congeladas a -80°C. Então os plasmídeos relativos aos clones 1, 2 e 3 foram purificados (a partir de alíquotas das células Top 10), e os pDNAs de cada clone foram analisados por eletroforese e quantificados por espectrofotometria a 260nm.

Figura 11 - Mapa do vetor pVAX1Luc, vetor este desenvolvido pela equipe de pesquisa a partir de um vetor comercial originalmente produzido pela PROMEGA (pVAX1).



Fonte: SnapGene.

Em paralelo, também encomendamos a síntese das sequências de siRNA (Synbio por meio da intermediária brasileira FastBio) a serem utilizadas nos ensaios de silenciamento do gene reporter Luciferase, e a sequência controle (siRNA scrambled). As sequências encomendadas foram baseadas no trabalho de Elbashir e colaboradores (ELBASHIR et al., 2001), sendo sequências de siRNA dupla fita cujo alvo é o gene GL3 Luciferase, presente no pVAX1Luc.

As sequências estão descritas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências dos RNAs de interferência utilizados nos ensaios.

Nome do siRNA	Sequência
Scrambled (controle)	5' - AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT - 3' 3' - TTUCGAAGUAUCCGCGUACG - 5'
Silenciamento do GL3 (ativo)	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3' 3'-TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU-5'

3.2.5. Eletroforese em gel de agarose

Para nos certificarmos de que as clonagens e purificação dos plasmídeos ocorreram de maneira eficiente, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de agarose. Após purificação foi preparado um gel de agarose na concentração de 0,8% em tampão TAE 1x. Foram utilizados 20 µL do marcador 1kb DNA ladder da BioLabs. Os tubos Eppendorfs contendo os plasmídeos foram descongelados e uma alíquota de 20 µL retirada e preparada com tampão de corrida. A eletroforese foi conduzida a 75 V, constantes, durante cerca de 2 horas e 15 minutos.

Géis também foram preparados para verificação dos plasmídeos das construções 1, 2 e 3 através de linearização por digestão enzimática com a enzima de restrição EcoRI.

3.3. Expressão em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

3.3.1. Expressão das proteínas recombinantes

As células de *E. coli* Star anteriormente selecionadas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer 250 mL contendo 20 mL de meio LB e 20 μ L de canamicina (30 μ g/ μ L) a 37°C e agitação de 200 rpm, overnight. No dia seguinte 1,5 mL do cultivo de cada construção foi adicionada a um respectivo frasco Erlenmeyer (totalizando 3 frascos) de 1,5 L com 150 mL de meio LB e 150 μ L de canamicina (30 μ g/ μ L). Os frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm até a DO₆₀₀ de 0,6. Nesse momento, as expressões das proteínas foram induzidas com IPTG na concentração final de 1,0 mM. Após 4 horas, as células foram recolhidas por centrifugação e os pellets congelados a -20°C.

3.3.2. Purificação das proteínas recombinantes

Os pellets de células anteriormente congelados (tópico Expressão de proteínas) foram descongelados, ressuspensos em tampão de equilíbrio (20mM de fosfato de sódio e 500mM de NaCl, pH 7,4) e rompidos por sonda de ultrassom intermitentemente em gelo por 1 min com intervalos de 4 min para resfriamento, com tempo total de “sonicação” de 5 min. Após o rompimento, as células foram centrifugadas a 4500g por 30 minutos. Tendo em vista a expectativa de que as proteínas fossem solúveis, os pellets foram reservados e as etapas de purificação prosseguiram com os sobrenadantes da etapa de centrifugação. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia IMAC (Immobilized Metal Ion Chromatography) por método batch (batelada) em resina de agarose-IDA-Ni²⁺ por meio de interação com o His-tag das proteínas.

Primeiramente 2 mL de resina que estava num Falcon de 15mL foi centrifugada a 900g por 5 minutos e o sobrenadante na qual estava armazenada (álcool etílico 20%) foi descartado. Em seguida, a resina foi equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio pH 7,4, inverteu-se o frasco no carrossel por 10 minutos, centrifugou-se a 900g por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido mais duas vezes para o correto equilíbrio da resina no tampão de adsorção. Posteriormente 10 mL da suspensão dos pellets sonicados de cada proteína foi centrifugado e cada sobrenadante foi adicionado sobre 1 mL de sua respectiva resina. A mesma foi incubada e agitou-se em agitador tipo carrossel durante 40 minutos. Centrifugou-se a 900g por 4 minutos, descartou-se o sobrenadante e completou-se

o volume para 10 mL com tampão de lavagem (20 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl e 70 mM imidazol, pH 7,4) e agitou-se em agitador tipo carrossel por 10 minutos. Esse processo foi repetido mais duas vezes.

Após a última lavagem acrescentou-se 3 mL de tampão de eluição pH 7,4 (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 1 M de imidazol), incubou-se invertendo no carrossel por 15 minutos e centrifugou-se a 900g por 4 minutos. O sobrenadante foi coletado em Falcons de 15 mL e armazenado na geladeira. O processo foi realizado individualmente com uma resina para cada proteína. Posteriormente, as proteínas foram dialisadas em tampão PBS pH 7,4, aliquotadas e armazenadas na geladeira para utilização futura.

3.3.3. Eletroforese SDS-PAGE

A avaliação da pureza das proteínas purificadas por cromatografia foi realizada por eletroforese SDS-PAGE. Um gel de poliacrilamida de concentração 12% foi primeiramente preparado, uma vez que é esperado que as três construções tenham diferentes massas moleculares: Construção 1: 36,6 kDa; Construção 2: 30,9 kDa; Construção 3: 35,1 kDa; e Construção 4: 36,15 kDa. Amostras de 20 µL de cada construção antes e depois de serem dialisadas foram preparadas com tampão de corrida (incubação de 4 min a 90°C). Além do marcador de massa molecular (Page Ruler Unstained Protein da Thermo Scientific, EUA) ao gel também foi adicionado em um poço a proteína BSA (Albumina de soro bovino) que tem massa molecular de 66,4 kDa. A BSA foi adicionada no volume de 20 µL, na concentração de 1 mg/ml, para que fosse possível comparar visualmente as concentrações das diferentes proteínas. A eletroforese foi conduzida a 120 V, 60 mA por cerca de 3 horas. Depois da corrida o gel foi removido da cuba e corado com corante Comassie blue overnight, após esse período o corante foi descartado e foi adicionada solução descorante (etanol 4,35%, ácido acético glacial 4,65%) na qual o gel foi incubado por 3 horas.

3.4. Avaliação da influência da expressão no crescimento celular

Para verificar se a presença dos plasmídeos e a expressão das diferentes proteínas pelas células *e.coli* estavam afetando negativamente a cultura, uma cinética simples de crescimento celular foi realizada para todas as construções, padronizando o início da cinética com a mesma DO₆₀₀ para todos os pré-inóculos. A cinética foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 70 mL de meio LB e 70 µL de antibiótico canamicina (30 ug/ul), incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm. A DO₆₀₀ dos diferentes cultivos foi medida a cada hora e a expressão das proteínas foi induzida por IPTG na concentração final de 1,0 mM quando as culturas atingiram a DO₆₀₀ aproximada de 0,6 UA. Ao fim da cinética as culturas foram centrifugadas a 4500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e os pellets celulares foram armazenados a -20°C.

3.5. Formação e caracterização dos complexos pDNA:proteína

Para a formação dos complexos pDNA:proteína foram utilizados 700 ng de pDNA, e diferentes volumes de proteína foram adicionados a fim de chegar a razões mássicas distintas, em seguida um volume pré-definido de tampão PBS pH 7,6 foi adicionado para chegar a um volume final de reação de 220 µL. Para as análises no DLS (Dynamic Light Scattering) ainda foram adicionados 790 µL de água ultrapura, completando o volume para 1,0 mL para leitura no equipamento ZetaSizer Nano ZS90, Malvern™. Cada amostra foi lida pelo aparelho em torno de 100 vezes, gerando-se assim uma curva de distribuição de tamanho das partículas e dados de polidispersidade da amostra, onde quanto mais próximo de 1, mais polidispersa é a amostra.

3.6. Cultivo celular, banco e ensaios com células tumorais

3.6.1. Crescimento das células

Para os ensaios com células de mamíferos, foram utilizadas duas linhagens celulares tumorais: células HeLa e células U87MG. Ambas as células foram cultivadas seguindo o mesmo protocolo. O meio de cultura utilizado foi F-12 (Ham) ou DMEM (Gibco) complementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino (Gibco), Antimicótico + antibiótico (1:100), Piruvato (1:100) e Aminoácidos não-essenciais (1:100). As células foram cultivadas em frascos de cultura de T25 cm² e incubadas em ambiente umidificado com 5% de CO₂ a 37°C até atingirem confluência de 70 a 90%. Prosseguindo para cultivo em placa de 96 poços ou congelamento para criação do banco.

3.6.2. Congelamento das células

Após o cultivo das células em frascos T-25, o meio foi retirado e descartado. Lavou-se as células com 5 mL de PBS e descartou-se o sobrenadante. Em seguida, 5 mL de solução de tripsina foi adicionada e o frasco incubado por 4 a 6 minutos a 37°C e 5% CO₂. O meio contendo as células tripsinizadas foi passado para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado por 5 minutos a 130g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e descartado, e as células ressuspendidas em 3,6 mL de soro fetal bovino e 400 µL DMSO (~10% de DMSO). O volume de 1 mL da suspensão de células foi passado para cada criotubo, e estes foram armazenados no ultra-freezer a -80°C.

3.6.3. Ensaios de citotoxicidade

Após as células serem cultivadas em garrafas T-25 até atingir confluência de 70 a 95%, elas foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas (como descrito anteriormente) e

ressuspensas em meio de cultura F12 contendo 10% de soro fetal bovino, sendo em seguida colocadas para crescer em uma placa de 96 poços. Em cada poço da placa foram adicionadas $5,0 \times 10^4$ células. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e 5% de CO₂, e no dia seguinte, foram adicionadas as proteínas recombinantes (construções 1 a 4) nas concentrações finais de 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 µM por poço, sendo feitas em triplicatas. Além disso, uma triplicata foi usada como controle onde foi adicionado apenas tampão PBS aos poços. As células foram então incubadas por 18 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período foi adicionado o reagente WST-1 (Merck), e as células incubadas por mais 1 hora, e então foi realizada a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 440 nm com comprimento de onda de referência de 650 nm em um leitor de placas. Posteriormente, o mesmo ensaio foi realizado com novas concentrações finais das proteínas: 1,25; 1,50; 1,75; e 2,0 µM. Os experimentos foram realizados tanto com células Hela (células controle, devido à baixa expressão de receptores integrina na membrana) como também com células U87MG (alta expressão de receptores integrina).

3.6.4. Ensaio de transfecção

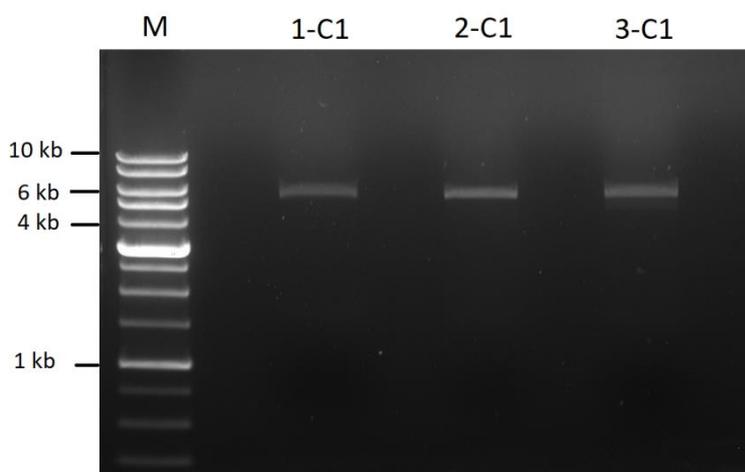
Neste experimento, após o crescimento das células U87MG em garrafa T-25 em meio F12 (Ham) (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino, as mesmas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e distribuídas em placas de 24 poços, na concentração $1,0 \times 10^5$ células por poço, onde cresceram por 24h até atingirem a confluência de 70%. As células foram então transfectadas com o plasmídeo pVAX1Luc (500 ng/poço) usando Lipofectamine 3000™ (Invitrogen) como reagente de transfecção de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então incubadas por 5h30, quando o meio foi substituído por F-12 (Ham) sem FBS, e as células foram transfectadas com complexos formados por 0,5µM de cada uma das proteínas individualmente e 40 nM de siRNA funcional (GL3) ou siRNA controle (*Scramble*), um controle positivo também foi utilizado, sendo ele Lipofectamine 3000™ + siRNA funcional (GL3). As células foram incubadas por mais 4 horas antes do meio ser substituído por F-12 (Ham) suplementado com soro fetal bovino. Após 24 horas da primeira transfecção com pVAX1Luc as células foram coletadas e analisadas utilizando Luciferase Assay System (Promega, USA) conforme as instruções do fabricante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Transformação das bactérias, preparação dos bancos de células e mini preparação plasmidial

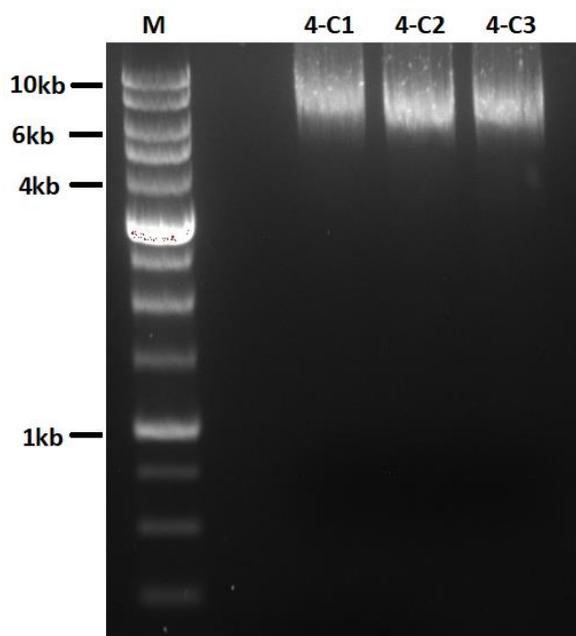
As construções de proteínas modulares foram desenhadas por nós, sintetizadas comercialmente e nos foram entregues já inseridas em vetor pET28a. Após a transformação das linhagens de *E. coli* Top 10 (linhagem de clonagem) e BL21(DE3) Star (linhagem de expressão), os plasmídeos (pDNAs) relativos às construções foram purificados (a partir das células Top 10). Os pDNAs foram analisados por eletroforese (Figura 12 e 13), com o intuito de avaliar se o tamanho correspondia ao esperado para cada construção. Pode-se observar que as transformações foram bem-sucedidas e que os vetores possuem os tamanhos esperados para cada uma das construções.

Figura 12 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos plasmídeos dos clones 1 das construções 1 a 3.



Foram linearizados por digestão enzimática com a enzima de restrição EcoRI. (M: marcador de peso molecular; 1-C1: construção 1, clone 1; 2-C1: construção 2, clone 1; 3-C1: construção 3, clone 1). Fonte: arquivo pessoal.

Figura 13 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos plasmídeos dos clones 1 a 3, da construção 4.



M: marcador de peso molecular; 4-C1: clone 1; 4-C2: clone 2; 4-C3: clone 3. Fonte: arquivo pessoal.

Diversas mini-preparações e quantificações de pDNA foram realizadas usando-se diferentes clones contendo cada um dos quatros plasmídeos (exceto o clone 2 das construções 1 a 3), como indicado na Tabela 4, abaixo. As diferenças de concentração se devem às variações nos protocolos.

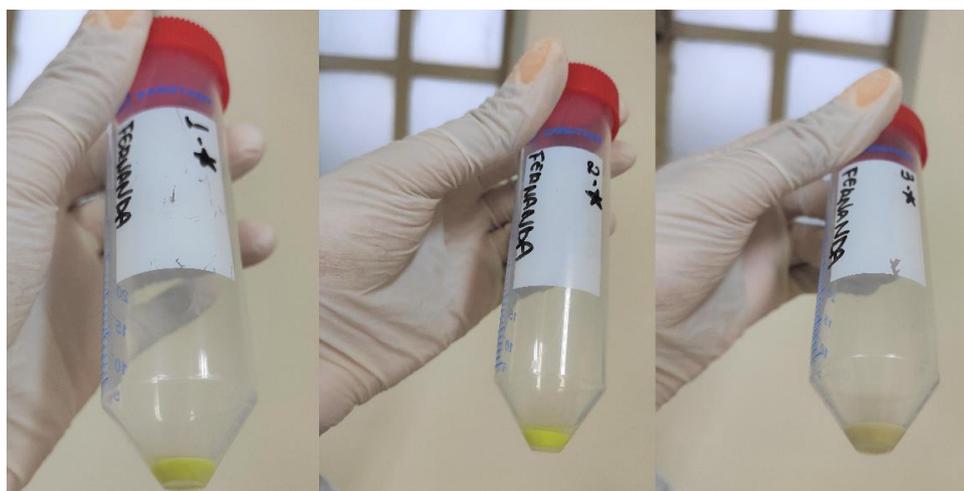
Tabela 4 - Quantificação de DNA plasmidial das construções das proteínas em diferentes mini-preparações.

Clones	Construção 1	Construção 2	Construção 3	Construção 4
1	282 ng/uL	264 ng/uL	251 ng/uL	100 ng/uL
2	-	-	-	99 ng/uL
3	22 ng/uL	19 ng/uL	20 ng/uL	81 ng/uL
4	21 ng/uL	21 ng/uL	19 ng/uL	-
5	22 ng/uL	18 ng/uL	21 ng/uL	-

4.2. Ensaio de expressão das proteínas modulares

Células *E. coli* BL21 (DE3) Star contendo os plasmídeos com as diferentes construções foram a seguir cultivadas em meio de cultura LB e utilizando-se frascos agitados para a avaliação da expressão das proteínas recombinantes. Após o cultivo das células, cuja expressão das proteínas foi induzida por IPTG, foi notável a coloração esverdeada (fluorescente) das bactérias, indicando que a expressão das proteínas modulares foi obtida com sucesso, como pode ser visto nas imagens da Figura 14.

Figura 14 – Tubos tipo Falcon contendo Pellet das bactérias que expressaram as construções de 1 a 3.

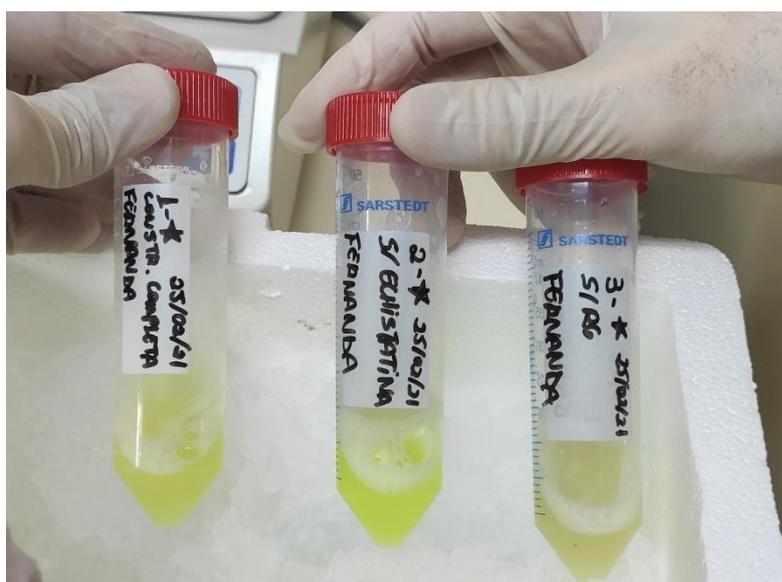


Pellets das bactérias após expressão, centrifugação e descarte do sobrenadante das construções 1 a 3. Da esquerda para a direita: construção 1, construção 2 e construção 3.

Fonte: arquivo pessoal.

A coloração verde, indicando a presença da GFP (*green fluorescent protein*) presente em todas as construções, se manteve no sobrenadante após o rompimento das células por ultrassom, indicando que as proteínas, majoritariamente, estariam solúveis (Figura 15).

Figura 15 - Tubos tipo Falcon contendo as bactérias que expressaram as construções de 1 a 3, em solução pós sonicação



Da esquerda para a direita: construção 1, construção 2 e construção 3. Fonte: arquivo pessoal.

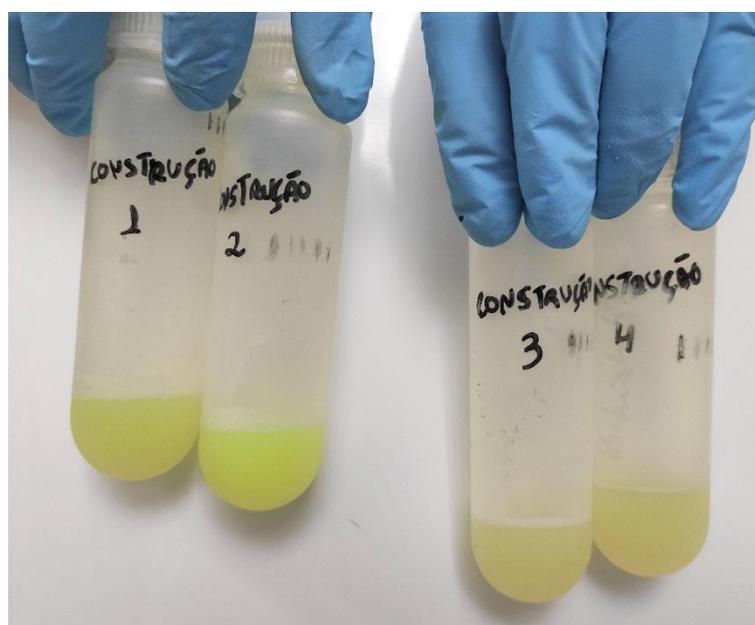
Quando comparamos as três construções, podemos notar que a intensidade da coloração verde varia entre elas. Isso poderia indicar diferenças no nível de expressão das proteínas recombinantes e/ou, possivelmente, diferenças de fluorescência entre as construções, algo já notado em trabalhos anteriores de nosso grupo utilizando a proteína GFP na presença de outros grupos no N- ou no C-terminal. Como descrito por FAVARO (Favaro et al., 2018), mesmo em proteínas modulares com a mesma composição, a alteração da localização dos módulos pode interferir no tamanho da nanopartícula formada e na intensidade da fluorescência emitida. Por exemplo, em um dos trabalhos desenvolvidos (FAVARO et al., 2018c), pode-se notar que uma construção baseada em GFP com o resíduo

de poliarginina (R9) localizado no N-terminal da construção emite mais fluorescência do que a construção com a poliarginina no C-terminal, sendo a construção com poliarginina no interior da proteína a que apresenta fluorescência intermediária.

No caso do trabalho aqui desenvolvido, observamos que a construção com R6 no meio dos módulos, porém com C-terminal da GFP livre (construção 2) foi a que apresentou maior intensidade de fluorescência, enquanto a construção sem a R6 e com o C-terminal da construção contendo Echistatina (construção 3) foi a menos fluorescente. Por fim, a construção com a sequência R6 no meio do módulo e Echistatina no C-terminal emitiu fluorescência intermediária. Este resultado demonstra que, também em nosso caso, a presença e posicionamento do módulo de poliarginina (R6) também foi fator determinante para essa característica das proteínas modulares aqui apresentadas, assim como a presença da Echistatina no C-terminal.

Como comentado anteriormente, após os experimentos iniciais com as construções 1 a 3, realizamos também estudos de expressão da proteína 4, que foi produzida e purificada juntamente com as proteínas 1 a 3. A imagem da Figura 16 mostra o lisado celular contendo as quatro diferentes proteínas, após a etapa de sonicação. Ainda que aparentemente menos intensa que as construções 1 e 2, a construção 4 também apresentou coloração esverdeada.

Figura 16 - Tubos contendo as bactérias que expressaram as proteínas de 1 a 4, em solução pós sonicação.

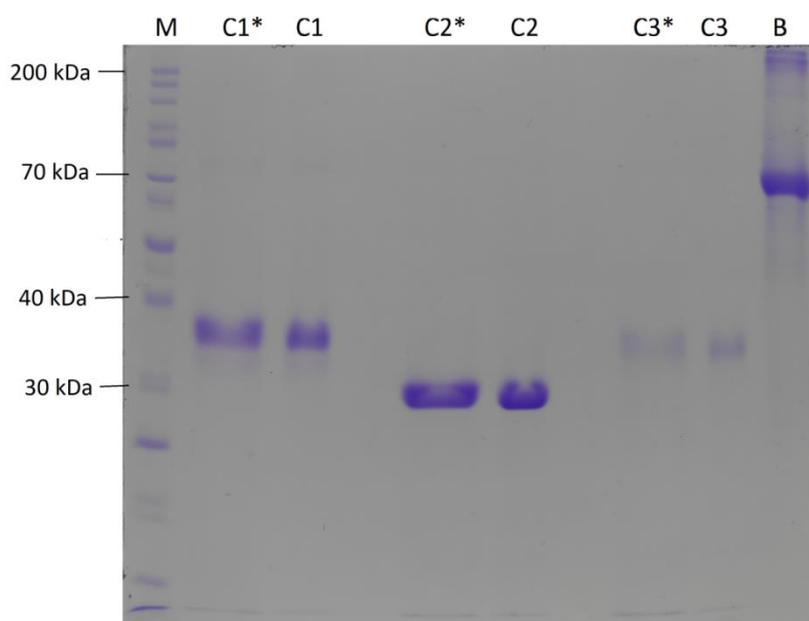


Da esquerda para a direita: construção 1, construção 2, construção 3 e construção 4. Fonte: arquivo pessoal.

4.3. Purificação das proteínas recombinantes

Nos estudos iniciais de purificação das proteínas, foram utilizados dois tipos diferentes de resinas IMAC com o objetivo de averiguar a eficiência no grau de purificação das diferentes construções. A análise foi feita com apoio do grupo do Dr. Geraldo Santana Magalhães, do Instituto Butantã. Estes estudos indicaram que as resinas não demonstraram diferenças expressivas na eficiência de captura ou no nível de pureza das proteínas, mostrando-se ambas igualmente eficientes em adsorver as proteínas. Isso indica também que a sequência de histidinas das construções está exposta nas superfícies das proteínas modulares. Uma análise das amostras de proteínas purificadas (antes e depois de serem dialisadas) foi feita através de SDS-PAGE. No gel de SDS-PAGE apresentado na Figura 17 podemos observar que não ocorreram perdas expressivas de proteína na diálise efetuada a seguir à etapa de purificação (em tampão PBS, pH 7,4) e que a cromatografia foi bem-sucedida, resultando em proteínas com concentração e grau de pureza adequados à continuidade dos estudos. Também foi notável o fato de que a proteína 3 foi produzida em uma menor concentração do que as outras proteínas.

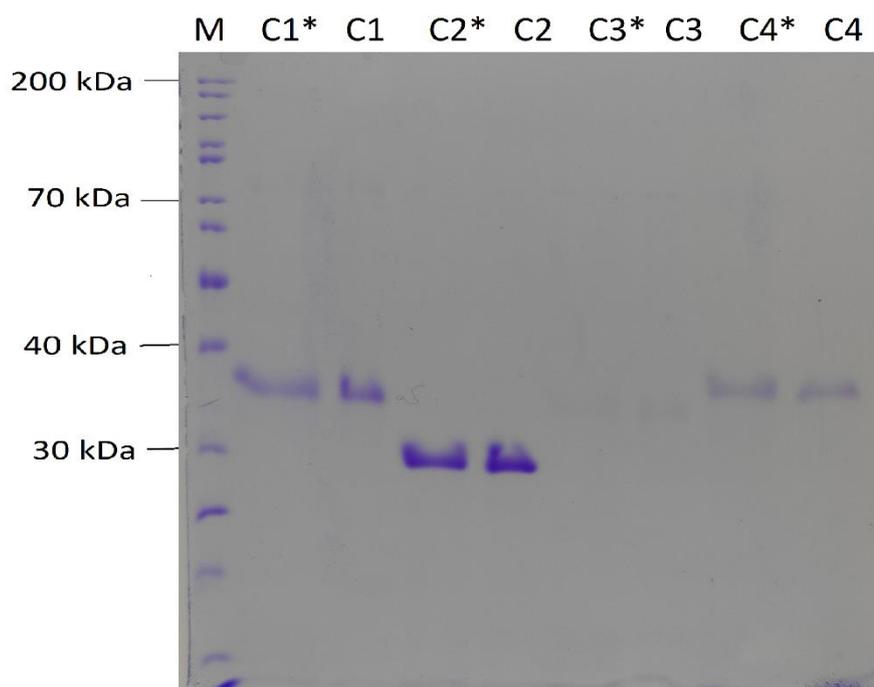
Figura 17 - Gel de SDS-PAGE comparando as proteínas antes e depois da diálise.



Proteínas antes (C1*: construção 1; C2*: construção 2; C3*: construção 3) e depois da diálise (C1: construção 1; C2: construção 2; C3: construção 3), comparadas com BSA 1mg/ml (B). M: marcador de peso molecular. Fonte: arquivo pessoal.

Um segundo estudo de purificação foi realizado a seguir, desta vez com as quatro diferentes construções. Neste estudo, foi alterado o tampão de equilíbrio da resina (e suspensão das células para a lise), acrescentando neste tampão uma concentração de 20 mM de imidazol. Podemos observar no gel de eletroforese diferenças visuais na concentração de proteína das construções 1 a 3, quando comparadas à purificação das alíquotas do processo anterior (Figura 18). Pode-se observar também que a proteína 4 foi capturada e purificada, ainda que em menores concentrações. A alteração do protocolo de adsorção (com a inclusão de imidazol) não se mostrou interessante e levou à diminuição da eficiência de adsorção das proteínas na resina, com perda de proteína no sobrenadante da adsorção e consequente diminuição na concentração de proteínas purificadas.

Figura 18 - Gel de SDS-PAGE comparando as proteínas antes e depois da dialise.

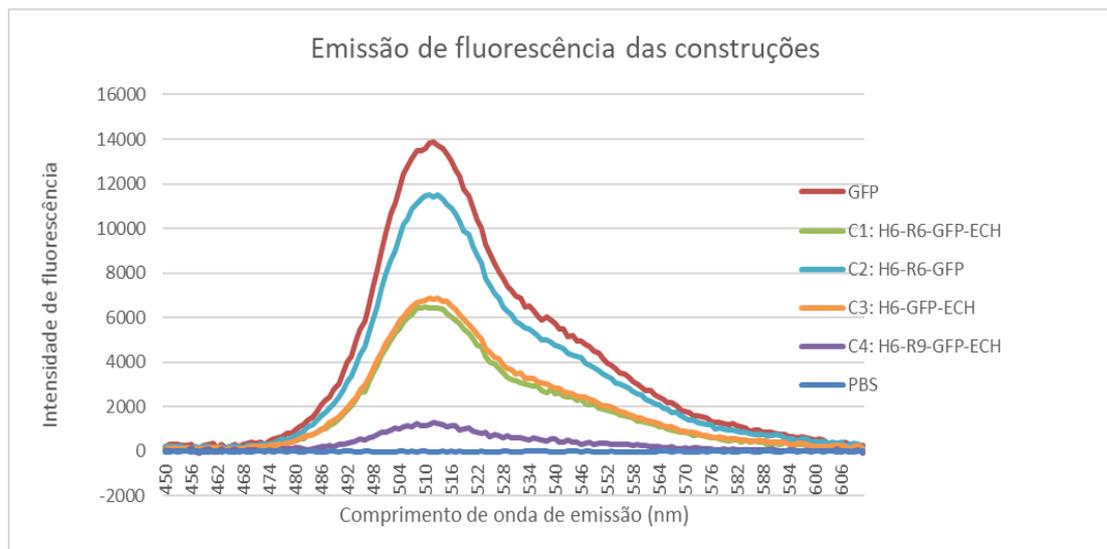


Proteínas antes (C1*: construção 1; C2*: construção 2; C3*: construção 3; C4*: construção 4) e depois da diálise (C1: construção 1; C2: construção 2; C3: construção 3; C4: construção 4). M: marcador de peso molecular. Fonte: arquivo pessoal.

4.4. Intensidade de fluorescência das construções

Utilizando um fluorímetro, análises da intensidade de fluorescência das construções foram realizadas buscando-se averiguar se a composição dos diferentes domínios/módulos afeta essa propriedade das proteínas. Utilizamos o comprimento de onda de 395 nm para excitação e uma faixa de emissão de 450 nm a 610 nm. Os resultados para as quatro construções de proteínas recombinantes modulares, e para a proteína GFP, podem ser vistos a seguir, na Figura 19.

Figura 19 - Curvas comparativos da intensidade da fluorescência de cada uma das construções de proteínas modulares normalizados pela concentração total de cada proteína.



Construção 1: H6-R6-GFP-ECH; Construção 2: H6-R6-GFP; Construção 3: H6-GFP-ECH; Construção 4: H6-R9-GFP-ECH, GFP recombinante (H6-GFP como controle positivo), e PBS (como controle negativo). Fonte: arquivo pessoal.

Como já previsto, devido à intensidade da coloração dos *pellets* celulares e das soluções de proteínas observadas a olho nu, todas as proteínas produzidas possuem fluorescência, mas com diferenças entre as construções. Pode-se notar que existe diferença significativa entre as intensidades de fluorescência das construções, sendo a construção 4 (H6-R9-GFP-ECH) a menos fluorescente, o que é coerente com o resultado de um trabalho anterior do grupo (FAVARO et al., 2018b), sugerindo a influência da R9, direta ou indiretamente, no enovelamento (*folding*) da GFP e na conformação da proteína modular como um todo, já que o estudo de espalhamento dinâmico de luz (DLS) também comprovou (resultados apresentados a seguir) que essa foi a única construção em que as proteínas se auto organizaram, espontaneamente na forma de nanopartícula, sem a necessidade de interação com material genético. Verificou-se também que o tampão utilizado nos ensaios (PBS pH 7,6) não deve ser capaz de afetar a fluorescência por si só, não influenciando na oligomerização, nem em mudanças conformacionais das construções, que poderiam afetar a capacidade de emissão do fluoróforo ou extingui-lo. A presença da sequência da Echistatina também parece afetar a fluorescência das proteínas, já que nas construções com ECH (construção 1: H6-R6-GFP-ECH e construção 3: H6-GFP-ECH) as intensidades foram

muito parecidas, mas na construção sem ECH a intensidade foi significativamente mais alta (construção 2: H6-R6-GFP). Por fim, a GFP recombinante (H6-GFP) foi a proteína com a maior intensidade de fluorescência analisada, e serviu como controle positivo para as outras construções, já que a fluorescência parte exclusivamente deste componente modular das construções, podendo os outros módulos apenas surtir alguma influência sobre ela.

Por ser fluorescente, a proteína GFP presente em todas as construções pode, além de “ancorar” os demais módulos/sequências funcionais, atuar como proteína repórter em estudos de direcionamento e “uptake” celular, usando-se microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Além da facilidade de expressão em *E. coli* e alta estabilidade e solubilidade, o fato de ser uma proteína repórter foi o principal fator de ter sido escolhida como a sequência “core” de nossas construções. Pelos resultados obtidos, todas as construções apresentam fluorescência, sendo mantida a funcionalidade esperada para a continuidade dos estudos com células

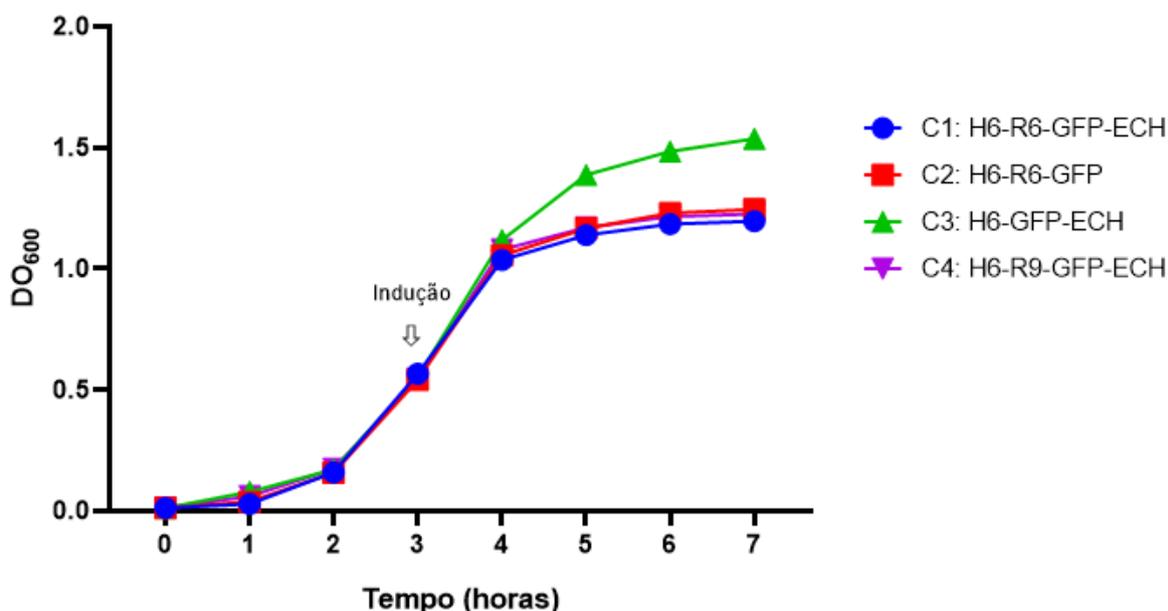
4.5. Avaliação da influência da expressão sobre o crescimento celular

Devido aos diferentes tons de verde das culturas após a expressão das construções, um estudo de cinética celular foi realizado para verificar se a expressão das proteínas estava afetando negativamente o crescimento das células e se esse era o motivo da variação na coloração. Células *E. coli* BL21 (DE3) Star contendo os plasmídeos com as diferentes construções foram a seguir cultivadas, em meio de cultura LB e usando frascos agitados. As DO₆₀₀ iniciais dos inóculos de todas as construções foram padronizadas. Como podemos ver no gráfico abaixo (Figura 20), o crescimento relativo das células foi semelhante, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre uma construção e outra, reforçando que nenhuma construção afeta mais as bactérias do que outra, e que, portanto, as diferenças de coloração não devem ser devido à alguma influência negativa na expressão, e sim às próprias características físico-químicas e morfológicas das proteínas modulares.

Como já comprovado por FAVARO (2018c), alterando apenas a ordem dos módulos já ocorrem divergências na emissão de fluorescência, assim como foi verificado nos nossos estudos que a presença ou ausência de algum módulo também afeta essa

característica das moléculas, sendo então esse o provável motivo das diferenças de coloração, sem nenhum problema atrelado à expressão das proteínas.

Figura 20 - Comparação da cinética de crescimento celular das bactérias *E. coli* portando as diferentes construções (C1 a C4).



Os pontos para construção da curva foram coletados a cada 1 hora e a expressão foi induzida com IPTG (1,0 mM) próxima a DO_{600} de 0,6 e continuou-se a coletar alíquotas até 4h após a indução. Fonte: arquivo pessoal.

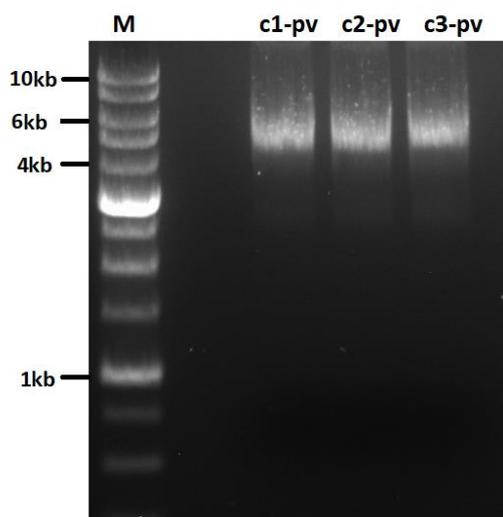
4.6. Obtenção do plasmídeo repórter pVAX1Luc para os estudos de silenciamento

Tendo em vista os ensaios seguintes de avaliação da capacidade das diferentes construções de direcionar ácidos nucleicos para células tumorais contendo receptores integrina na superfície, procuramos transformar células de *E. coli* com o vetor pVAX1Luc e purificar o plasmídeo. Como descrito na seção de Materiais e Métodos o plasmídeo pVAX1Luc foi desenvolvido originalmente para vacinação gênica, ele contém um promotor do citomegalovírus humano (CMV), o gene repórter da Luciferase, o gene de resistência à

Canamicina e a origem de replicação procariota pmb1. O pVAX1Luc já foi utilizado previamente em outros trabalhos do grupo (FAVARO, 2018) tendo protocolos e resultados bem estabelecidos em estudos de entrega gênica.

Após a transformação das células *E.coli* Top 10 com o plasmídeo pVAX1Luc, os clones selecionados tiveram seus plasmídeos purificados pelo método de mini-preparação que foi analisada por eletroforese (Figura 21) e quantificada por espectrofotometria a 260 nm (Tabela 5).

Figura 21 - Gel de agarose obtido visando a verificação dos clones 1 a 3, do plasmídeo repórter pVXA1Luc.



M: marcador de peso molecular; C1-pv: clone 1; C2-pv: clone 2; C3-pv: clone 3). Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 5 - Quantificação de DNA plasmidial em diferentes mini-preparações do plasmídeo repórter pVAX1Luc.

Clones	pVAX1Luc
1	288 ng/uL
2	258 ng/uL
3	279 ng/uL

4.7. Diâmetro Hidrodinâmico Médio das Proteínas e Nanopartículas

As análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) forneceram o diâmetro hidrodinâmico médio das possíveis nanopartículas formadas a partir da interação das proteínas (construção 1 a 4) com DNA plasmidial (pVAX1Luc), bem como, os valores de polidispersidade de tamanhos. Os valores do índice de polidispersão (PDI) variam de 0, para uma amostra idealmente monodispersa, a 1, para uma amostra com uma larga distribuição de tamanho (polidispersa) (FAYAD, 2009).

Para este estudo de DLS foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano ZS90, Malvern™. Na Tabela 6 podemos observar o tamanho do diâmetro médio do pDNA em solução. Essa mesma quantidade de pDNA foi utilizada em todas as análises dos complexos pDNA: proteína realizados por DLS em nosso trabalho (Tabela 6).

Tabela 6 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade do pDNA utilizado nas interações pDNA:proteína.

Massa de pDNA	Diâmetro médio (nm)	Porcentagem (%)	Polidispersidade (PDI)
700 ng	167,5	98,1	
	713,8	1,9	1

Podemos observar uma tendência predominante das moléculas de pDNA de formarem partículas com diâmetro médio de 167,5 nm, tamanho condizente com outros estudos do grupo. Sabendo o tamanho da partícula formada pelo pDNA em solução, podemos verificar se as construções que interagem com o mesmo estão sendo capazes de condensá-lo, ou seja, formando nanopartículas de tamanho menor do que o observado quando temos apenas o pDNA.

Podemos observar uma tendência predominante das moléculas de pDNA de formarem partículas com diâmetro médio de 167,5 nm, tamanho condizente com outros estudos do grupo. Sabendo o tamanho da partícula formada pelo pDNA em solução, podemos verificar se as construções que interagem com o mesmo estão sendo capazes de condensá-lo, ou seja, formando nanopartículas de tamanho menor do que o observado quando temos apenas o pDNA.

Ao analisar a construção 1 (H6-R6-GFP-ECH), podemos notar que a proteína sozinha não forma nanopartículas (0,89 nm). Também é notável que existe formação de nanopartículas quando a mesma interage com pDNA (desde a razão 1:1 até 1:60), sendo essas mais estáveis e monodispersas conforme se aumenta a razão mássica relativa do complexo pDNA:proteína, como pode ser visto a seguir (Tabela 7).

Tabela 7 - Diâmetro hidrodinâmico médio apresentado nanômetros e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 1) em diferentes razões mássicas.

Razão mássica pDNA:proteína	Diâmetro médio (nm)	Porcentagem em número (%)	Polidispersidade (PDI)
1:1	208,6	1,4	0,766
	73,92	98,6	
1:5	329,9	0,6	0,969
	66,12	99,4	
1:20	125,9	100	0,699
1:40	85,76	100	0,544
1:60	95,76	100	0,539
Apenas proteína	0,890	100	0,582

Na solução com a construção 2 (H6-R6-GFP) parece ocorrer a formação de agregados em razões mássicas menores (1:1 até 1:20), começando a formar nanopartículas a partir da razão 1:40, sendo a 1:60 mais monodispersa. A proteína também não é capaz de se “auto-montar” sem a presença do pDNA, apresentando diâmetro de 0,658 nm (Tabela 8).

Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 2) em diferentes razões mássicas.

Razão mássica pDNA:proteína	Diâmetro médio (nm)	Porcentagem em número (%)	Polidispersidade (PDI)
1:1	403,3	100	0,896
1:5	413,2	100	1
1:20	318,9	100	1
1:40	366,3	1,4	
	73,3	98,6	0,853
1:60	336	2	
	82,61	98	0,671
Apenas proteína	0,658	100	0,521

Como podemos ver na Tabela 9, a construção 3 (H6-GFP-ECH) aparentemente não interage com o pDNA, não formando nanopartículas, sendo seu diâmetro compatível com o diâmetro da proteína sozinha (0,695nm) mesmo com pDNA presente. Quando na razão de 1:40, temos um aumento no diâmetro (10,77 nm) que não é compatível com interação com o material genético, podendo ser uma pequena agregação da proteína. Esse resultado é esperado, já que essa construção não conta com o módulo de poliargininas (R6 ou R9), responsável pela interação e complexação do DNA, sendo essa construção, portanto, um controle.

Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das possíveis nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 3) em diferentes razões mássicas.

Razão mássica pDNA:proteína	Diâmetro médio (nm)	Porcentagem em número (%)	Polidispersidade (PDI)
1:1	311,1	99,3	1
	1043	0,7	
1:5	0,78	100	0,897
1:20	0,66	100	0,727
1:40	10,77	100	0,714
Apenas proteína	0,624	100	0,695

Os ensaios com a construção 4 (H6-R9-GFP-ECH) demonstraram que diferentemente das construções 1 e 2, ela além de formar nanopartículas interagindo com pDNA, é capaz de se auto-montar sem a presença do mesmo (Tabela 10). Demonstrando que a substituição da poliarginina R6 para R9 faz diferença no quesito automontagem, assim como foi visto em algumas construções utilizando R9 pelo grupo no passado (FAVARO et al., 2018), corroborando a importância desse módulo na construção.

Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico médio e polidispersidade das nanopartículas formadas pela interação pDNA:proteína (pDNA:Construção 4) em diferentes razões mássicas.

Razão mássica pDNA:proteína	Diâmetro médio (nm)	Porcentagem em número (%)	Polidispersidade (PDI)
1:1	277,2	7,4	
	100,8	92,6	0,729
1:5	249,9	1,8	
	95,6	98,2	0,724
1:20	164,2	100	0,461
Apenas proteína	146	94	
	35,91	6	0,27

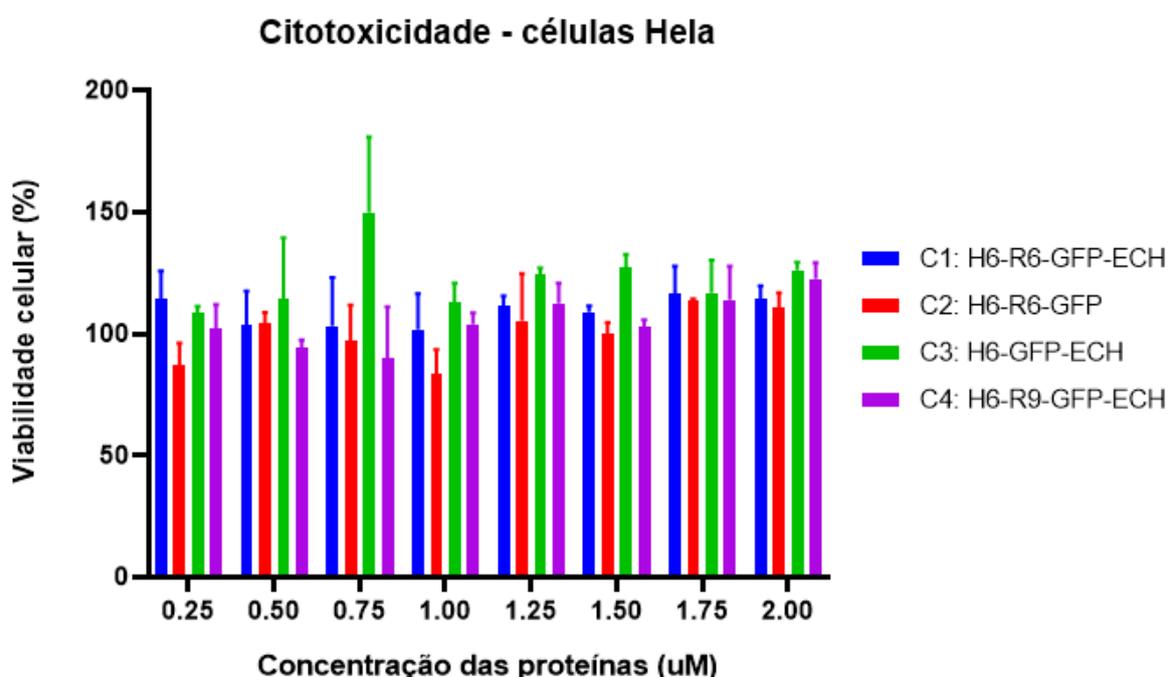
4.8. Ensaio de citotoxicidade

Antes de avaliarmos a eficiência da transfecção das proteínas modulares, se fez necessário realizarmos ensaios de citotoxicidade com as linhagens tumorais Hela (controle) e U87MG (superexpressam integrinas que são alvo da Echistatina), pois além da Echistatina servir de direcionamento, é sabido que ela também pode oferecer algum nível de toxicidade para as células que têm receptores correspondentes. Nesse caso, verificamos se essa característica da Echistatina se manteve nas proteínas modulares aqui propostas e em quais concentrações afetam as células e em qual intensidade, para posteriormente escolher uma

concentração que seria funcional para entrega do siRNA, pois vetores não-virais também devem ser de baixa citotoxicidade e imunogenicidade para cumprir seu papel.

No gráfico abaixo (Figura 22) podemos ver a citotoxicidade das proteínas para as células Hela em diferentes concentrações. De acordo com esses resultados, independentemente do aumento das concentrações, e de quais são as construções, as células Hela se mantêm viáveis sem serem afetadas. A baixa suscetibilidade dessas células às proteínas é um indício de um alto grau de especificidade e direcionamento das construções. Isso se deve ao fato das células Hela não superexpressarem as integrinas alvo da Echistatina, não se ligando à proteína e, portanto, não sofrendo consequências dessa interação.

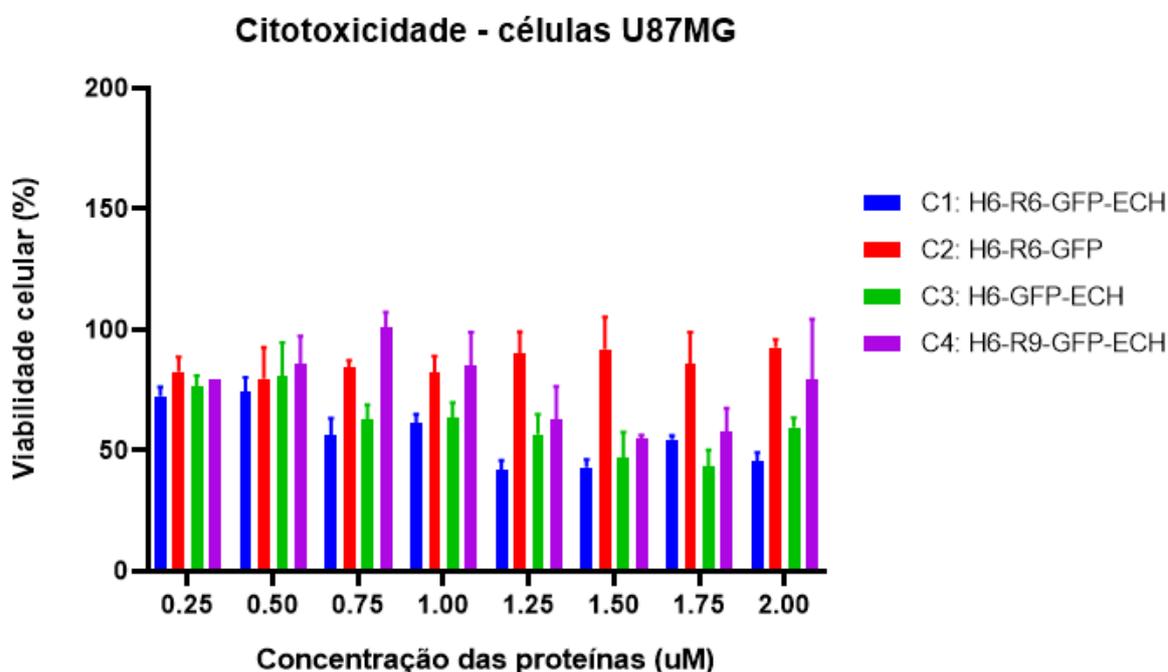
Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade com células Hela de cada uma das construções de proteínas modulares



Construção 1: H6-R6-GFP-ECH; Construção 2: H6-R6-GFP; Construção 3: H6-GFP-ECH; Construção 4: H6-R9-GFP-ECH em diferentes concentrações de 0,25uM a 2uM, após 18 horas de contato com as células. Fonte: arquivo pessoal.

Já no gráfico dos ensaios com as células U87MG (Figura 23), podemos perceber que as células são afetadas em sua viabilidade e que quanto maior a concentração, mais tóxicas as construções que contêm Echistatina são para as células, sendo as construções 1 (H6-R6-GFP-ECH) na concentração 2 uM e 3 (H6-GFP-ECH) na concentração 1,75 uM as mais tóxicas para as células (45,4% e 46,7% de viabilidade celular, respectivamente). A construção 2 (H6-R6-GFP) não afeta as células de maneira significativa (na concentração de 2 uM a viabilidade celular foi de 92,7%) e a construção 4 (H6-R9-GFP-ECH) parece ser a construção com Echistatina que afeta as células na menor escala (a maior toxicidade apresentada por ela foi a 1,75 uM tendo as células 57,7% de viabilidade). Isto pode ser devido à sua propriedade desta proteína de formar “nanorods” mesmo sem um ácido nucléico presente, fato que ocorre devido à presença da R9 na construção como demonstrado anteriormente em outros trabalhos do grupo (FAVARO, 2018). É possível que essa conformação possa atrapalhar de alguma forma a interação da Echistatina presente no C-terminal com os receptores integrinas das células.

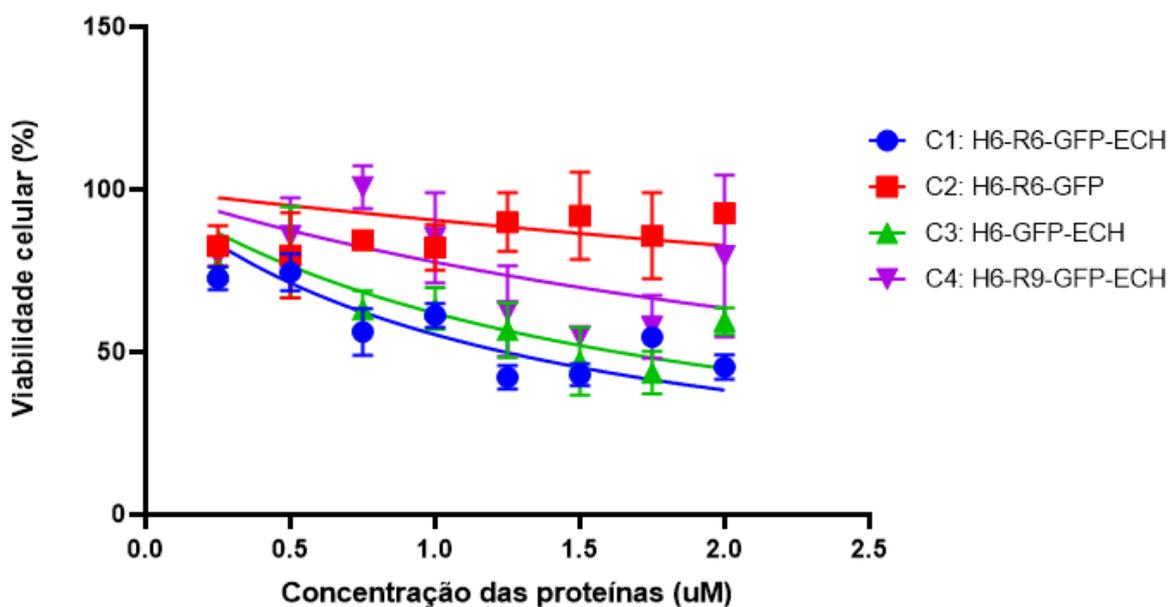
Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade com células U87MG de cada uma das construções de proteínas modulares.



Construção 1: H6-R6-GFP-ECH; Construção 2: H6-R6-GFP; Construção 3: H6-GFP-ECH; Construção 4: H6-R9-GFP-ECH em diferentes concentrações, de 0,25uM a 2uM, após 18 horas de contato com as células. Fonte: arquivo pessoal.

Posteriormente, utilizando o software GraphPad Prism 8, foi construída uma curva dose-resposta das proteínas (Figura 24) de acordo com o aumento da concentração molar, e calculado o IC50 (concentração de proteína a qual é capaz de inibir a viabilidade celular em 50%, ou seja, levar à morte de 50% das células) de cada uma das proteínas que mais afetaram as células. IC50 da proteína 1: 1,24 uM; e da proteína 3: 1,62 uM.

Figura 24 - Curva Dose-resposta do ensaio de citotoxicidade com células U87MG de cada uma das construções de proteínas modulares.



Construção 1: H6-R6-GFP-ECH; Construção 2: H6-R6-GFP; Construção 3: H6-GFP-ECH; Construção 4: H6-R9-GFP-ECH em diferentes concentrações, de 0,25uM a 2uM, após 18 horas de contato com as células. Fonte: arquivo pessoal.

O comportamento demonstrado pelas construções contendo Echistatina (citotoxicidade) era esperado, pois esta sequência foi, em outro estudo (SIQUEIRA et al., 2019), capaz de atuar de forma sinérgica com uma toxina (fosfolipase D), uma classe de

toxina que podem degradar os fosfolipídios da membrana celular, gerando produtos bioativos como cPA que tem funções antitumorais. A proteína de fusão criada neste estudo, liderado pelo prof. Geraldo Santana do Instituto Butantan, chamada Rechistatina, foi capaz de se ligar às células de melanoma murino B16F10 que também superexpressam a integrina $\alpha\beta3$ e foi também capaz de causar morte celular, principalmente nas concentrações de 1 e 3 μM .

Os resultados obtidos aqui, em nosso estudo, demonstram que a capacidade citotóxica da Echistatina foi bem preservada, nas construções C1 e C3 já que ambas conseguiram inviabilizar 50% das células U87MG em concentração menor que 2 μM , atuando sinergicamente com os outros módulos. Com isso foi possível também verificar que a Echistatina pode ser um bom componente em proteínas modulares para direcionamento à outras células que superexpressam as integrinas $\alpha\beta3$ quando visamos a estratégia de morte celular, pois a presença de outros componentes não impediu sua ligação aos receptores e consequente atuação.

4.9. Transfecção com siRNA para células U87MG

Uma vez que é previsto para a proteína modular aqui desenvolvida ter a capacidade de interação com ácidos nucleicos através do domínio de poliarginina (R6 ou R9), iniciamos ensaios de avaliação desta capacidade por meio da entrega de RNA de interferência (siRNA), visando a preferência de entrega para células que superexpressam o receptor integrina (U87MG).

Tendo em vista os ensaios de avaliação da citotoxicidade já realizados, escolhemos a concentração de proteína de 0,5 μM para este estudo inicial, utilizando complexos formados entre as diferentes proteínas e o siRNA (chamado aqui de GL3 funcional) capaz de silenciar a enzima repórter luciferase. Também foram usados neste estudo, complexos formados entre as proteínas e siRNA controle (chamado aqui de *Scrambled*), sendo esta uma sequência incapaz de gerar silenciamento do gene da luciferase. Cada complexo com siRNA funcional teve seu par controle com siRNA *scrambled* para comparação da eficiência de entrega, todos em triplicata (Figura 25).

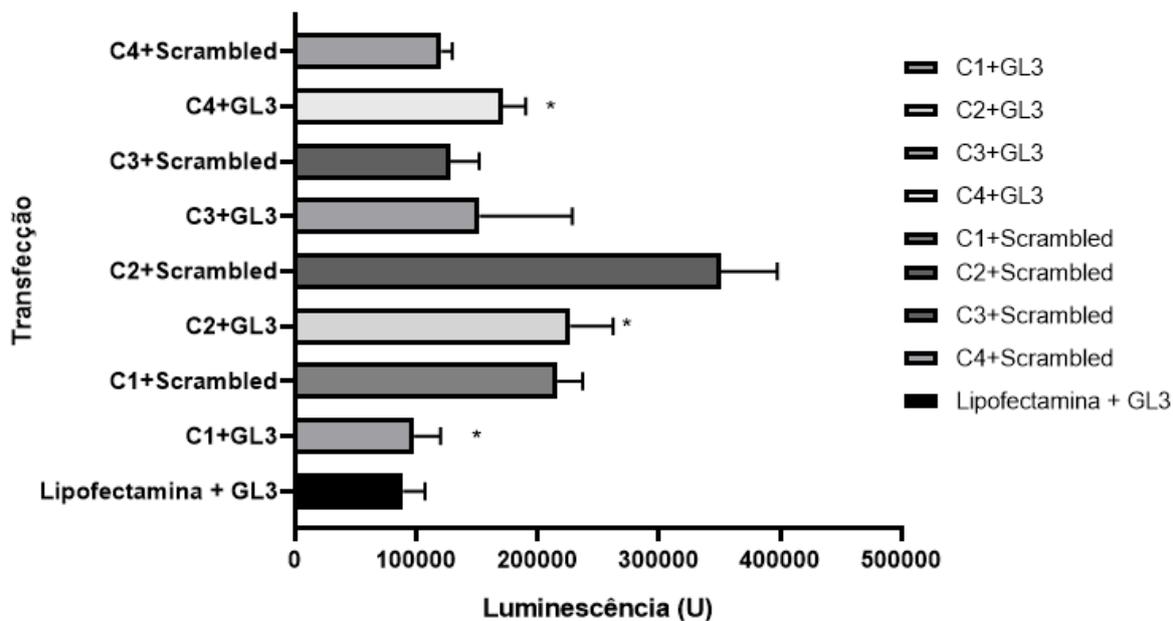
Os resultados indicam que a construção 1 (H6-R6-GFP-ECH) foi capaz de entregar eficientemente o siRNA (Construção 1 + GL3) para as células, de forma similar ao controle positivo utilizando lipofectamina (lipofectamina + GL3). Não foram observadas diferenças significativas entre ambos os grupos ao se realizar o teste-t, e ainda assim tendo uma intensidade de luminescência quase 2 vezes menor, com diferença significativa ($p < 0,05$) que seu controle pareado (C1 + *Scrambled*). Este resultado indica a capacidade desta construção (C1) como nanopartícula para entrega de RNA de interferência direcionada à linhagem tumoral, que tem como característica a superexpressão de receptores integrina $\alpha v \beta 3$.

A construção 2 (H6-R6-GFP) também foi capaz de entregar o siRNA (C2 + GL3), apresentando diferença significativa comparada a seu controle (C2 + *Scrambled*), porém foi menos eficiente que a construção 1 e a lipofectamina, demonstrando que a presença da Echistatina colabora de alguma forma para o sucesso da entrega do siRNA na construção 1.

A construção 3 (H6-GFP-ECH) não apresentou diferenças entre o grupo com siRNA funcional (C3+GL3) ou controle (C3 + *Scrambled*), o que já era esperado, pois apesar dessa construção ter a Echistatina para direcionamento, ela não possui a sequência R6, sendo um controle de interação com ácidos nucleicos. Por não possuir poliargininas (R6 ou R9) compondo algum de seus módulos, ela parece ser incapaz de interagir, condensar e entregar material genético.

Por fim, a construção 4 (H6-R9-GFP-ECH) apresentou resultado inconclusivo já que o complexo controle (C4+*Scrambled*) apresentou sinal menor que o complexo funcional (C4+GL3), isso pode indicar que a proteína não está sendo capaz de entregar eficientemente os siRNAs (que como citado anteriormente, pode ser devido à presença de R9 que pode estar: 1) impedindo a interação correta da Echistatina com os receptores integrina e/ou 2) formando nanopartículas antes de interagir e envolver os siRNAs, não sendo capaz de entregá-los, já que nessa construção as nanopartículas são formadas antes mesmo da interação com material genético).

Figura 25 - Eficiência de silenciamento da expressão do gene da enzima repórter luciferase por meio dos complexos de cada proteína com siRNA funcional (C+GL3).



As eficiências foram analisadas comparando cada complexo (C+GL3) com seu respectivo controle (C+Scrambled), sendo que (*) significa diferença significativa ($p < 0,05$) entre estes dois valores. O experimento foi realizado em células U87MG, com proteínas na concentração de 0,5 μ M e com siRNA a 40 nM. Os ensaios foram realizados em triplicata. Fonte: arquivo pessoal.

Entendemos que a combinação dos módulos gerando uma construção proteica (C1) capaz de entregar material genético com especificidade, bem como um efeito terapêutico, tendo uma citotoxicidade apenas nas células que superexpressam os receptores integrina, é um avanço para estudos na área, pois ambos os fatores podem atuar de maneira sinérgica ou serem explorados em diferentes estratégias antitumorais. O direcionamento à linhagem tumoral específica acaba por ser uma vantagem em comparação a outros estudos com proteínas modulares desenvolvidas anteriormente em nosso grupo, como por exemplo a proteína recombinante T-RP3 desenvolvida por Favaro (2018a), que explora o peptídeo membrano ativo TAT (translocação de membranas) juntamente com a cadeia leve de dineína RP3 (para translocação até o núcleo). Neste último caso, ainda que bem-sucedido para entrega gênica, não confere especificidade à entrega, necessitando algum tipo de direcionamento para aplicação em oncoterapia.

Por fim e igualmente importante, já existe na literatura indícios de que as desintegrinas funcionem para direcionamento, tanto *in vitro* como *in vivo*, como é o caso de uma proteína de fusão desintegrina-polímero que mantém a especificidade para o alvo em ambos os casos (JANIB et al., 2014), onde a captação ocorre por um processo saturável por meio de ligação e internalização específicas aos receptores heterodiméricos da integrina localizados na superfície das células endoteliais e cancerígenas, bem como da neovasculatura do tumor. Isso demonstra boas perspectivas futuras para terapias que funcionem *in vivo* utilizando proteínas modulares com desintegrinas, como as aqui estudadas. Tendo isso aliado aos resultados de entrega de siRNA obtidos no estudo de mestrado aqui desenvolvido, podemos pensar em estratégias futuras para entrega de siRNAs funcionais que silenciem genes responsáveis pelo agravamento ou metástase de tumores que superexpressam integrinas, como algo palpável.

5. CONCLUSÃO

As etapas de síntese, clonagem, expressão e purificação das diferentes proteínas modulares ocorreram sem grandes entraves e com os resultados esperados. O fato de as culturas adquirirem coloração esverdeada devido à GFP, após a indução da expressão de proteína, facilita no controle e desenvolvimento dos estudos, por ser um indicativo simples do nível de expressão, de fácil acompanhamento. Pôde-se notar uma diferença significativa na expressão da proteína da construção 3, quando comparada às construções 1, 2 e 4, ao menos nas condições de cultivo estudadas. Contudo, essa menor eficiência de expressão da construção 3, não interferiu negativamente no trabalho, sendo compensado com alterações no protocolo de indução da expressão da proteína. O ensaio de cinética de crescimento celular nos mostrou que a expressão das proteínas não afeta significativamente as bactérias que as produzem e que, portanto, esse não é o fator determinante das diferentes intensidades de coloração das culturas obtidas após a expressão.

Posteriormente à expressão e purificação, demos continuidade aos estudos e iniciamos a caracterização físico-química das proteínas e dos complexos proteína:pDNA, averiguando estabilidade e diâmetro hidrodinâmico com DLS, que nos forneceu dados importantes para o entendimento da funcionalização das proteínas. Conseguimos comparar os diâmetros hidrodinâmicos das proteínas em solução, sem e com a presença de pDNA, sendo observado que as proteínas 1 e 2 são capazes de interagir com pDNA e formar nanopartículas. Além disso, foi visto que a construção 3 não interage significativamente com o pDNA, como já era esperado. Os ensaios também indicam que a construção 4 é capaz de se “auto-montar”, na forma de nanopartículas, mesmo sem a presença de pDNA, provavelmente devido à presença da poliarginina R9 na estrutura proteica.

Os ensaios de fluorescência realizados nos ajudaram a entender melhor as possíveis causas das diferentes intensidades de fluorescências entre as proteínas, mostrando que a presença da Echistatina, assim como a presença da poliarginina R9 afetam negativamente direta ou indiretamente, a emissão de fluorescência. As construções com Echistatina (construção 1, 3 e 4) apresentaram menor fluorescência do que as proteínas sem Echistatina (construção 2 e GFP recombinante). Tudo isso indica que a organização dos diferentes domínios/seqüências da proteína tem impacto sobre a GFP, seja por uma perturbação na estrutura da proteína fluorescente levando a modificações na região do grupo

fluoróforo, seja por supressão da fluorescência devido a interações cruzadas proteína-proteína, como possivelmente no caso da construção 4.

Além da caracterização das proteínas e complexos, esperávamos verificar uma correlação entre características físico-químicas (capacidade de condensação de DNA, diâmetro das partículas etc.) e o nível de transfecção das células, além de um direcionamento preferencial das nanopartículas para as linhagens celulares que superexpressam o receptor integrina $\alpha\beta3$. Este é o caso da linhagem tumoral U87MG, sendo que as células HeLa são pouco afetadas, por serem deficientes na expressão desse tipo de receptor (Li-Li et al., 2011). Nos nossos estudos, a construção completa (C1: H6-R6-GFP-ECH) foi bem-sucedida em atingir os objetivos pretendidos neste trabalho, sendo não apenas capaz de entregar siRNA para as células de maneira eficiente, mas também tendo efeito citotóxico para as células tumorais U87MG, ponto que pode ser explorado de maneira positiva no desenvolvimento de uma terapia antitumoral voltada a células que superexpressam o receptor integrina $\alpha\beta3$. Dessa forma, consideramos este estudo um avanço na área, pois conseguimos aliar o direcionamento eficiente com uma entrega gênica eficiente em uma única biomolécula que é facilmente produzida e purificada.

Foi possível também observar um efeito da presença dos diferentes “módulos” ou domínios das proteínas comparando a construção completa (C1: H6-R6-GFP-ECH) com seus controles de direcionamento (C2:H6-R6-GFP) e de condensação e interação com ácidos nucleicos (C3: H6-GFP-ECH). O conjunto completo dos módulos (C1) acabou levando ao aumento na capacidade de superação de diferentes barreiras à entrega gênica especificamente para as células U87MG devido ao emprego da Echistatina que tem direcionamento para receptores Integrina $\alpha\beta3$ superexpressos, não apenas nessa linhagem, mas em vários tipos de tumores. Os resultados, portanto, indicam ser esta uma abordagem promissora que pode ser ainda mais estudada e aprofundada, por meio de análises utilizando-se outras linhagens tumorais que superexpressam esses receptores, avaliação dos mecanismos envolvidos na morte celular, testes *in vivo* e de transporte e entrega de diferentes moléculas terapêuticas.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No trabalho aqui apresentado estudamos 4 proteínas diferentes, sendo duas delas controle. Verificamos ao decorrer do trabalho que as proteínas possuem comportamento diferente entre si dado às mesmas circunstâncias, como por exemplo na formação de nanopartículas na presença ou ausência de ácidos nucleicos. Seria então importante verificar a estabilidade e comportamento dessas proteínas num espectro maior de heterogeneidade ambiental, alterando fatores como pH, concentração de sais e temperatura, dessa forma, no futuro ao se trabalhar em condições com mais fatores associados, será possível entender melhor o comportamento esperado para essas proteínas nessas situações, podendo atribuir o ocorrido à uma causa previamente estudada, eliminando algumas variáveis. Além disso, realizar uma microscopia eletrônica pode ser interessante como uma checagem dupla sobre a conformação que os complexos estão assumindo.

Outra questão importante seria estudar como, e se, está ocorrendo a internalização das proteínas, por meio de microscopia confocal e FACS. Assim seria possível entender melhor o mecanismo pelo qual está sendo possível obter os resultados aqui descritos.

Como próximos passos seria interessante também testar a capacidade de entrega gênica bem como a citotoxicidade dessas proteínas em células tumorais de linhagens diferentes, mas que também tenham superexpressão da integrina aqui estudada, podendo assim verificar a amplitude de aplicabilidade das moléculas. Também é importante verificar as doses respostas com o IC50, encontrado as melhores condições para uso terapêutico da proteína. Posteriormente, realizar testes *in vivo* com animais (camundongos), e caso haja sucesso, trabalhar no desenvolvimento e melhoramento do processo de expressão, purificação da proteína e escalonamento, de maneira a obter a molécula em maiores quantidades. Por fim, seria importante estudar uma formulação e testes destas formulações, a fim de decidir a melhor maneira de administração da terapia e com qualidade adequada para ensaios pré-clínicos e clínicos (respeitando as regras/leis para tal).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES R.F., FAVARO M.T.P., BALBINO T.A., TOLEDO M.A.S., DE LA TORRE L.G., AZZONI A.R.. Recombinant protein-based nanocarriers and their association with cationic liposomes: characterization and *in vitro* evaluation. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 513, p. 1-10, 2017.
- ANSELMO, A.C., MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update. *Bioengineering & Translational Medicine*, v.4, n.3, 2019.
- AUDOUY S.A., DE LEIJ L.F., HOEKSTRA D. e MOLEMA G. *In vivo* characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm Res*, v. 19, n. 11, p. 1599-605, 2002.
- AZZONI A.R., RIBEIRO S.C., MONTEIRO G.A., PRAZERES D.M. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med*, v. 9, n. 5, p. 392-402, 2007.
- BACHMANN M., KUKKURAINEN S., HYTÖNEN V.P., WEHRLE-HALLER B. Cell adhesion by integrins. *Physiol Rev*, v.99, n.4, p. 1655–1699, 2019.
- BEREZIKOV E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet*, v.18, n.12, p. 846-60, 2011.
- BRAY F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: BW Stewart, CP Wild, eds. World Cancer Report 2014. WHO Press, p. 42- 55, 2014.
- BRAY F., LAVERSANNE M., WEIDERPASS E., SOERJOMATARAM I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. In press, v.127, p. 3029-3030, 2021.
- BONET F.F., HERNANDEZ, F.J. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. *Revista Científica da FMC*, v. 9, n. 2, 2014.
- BOOHAKER R.J., LEE M.W., VISHNUHOTLA P., PEREZ J.M., KHALED A.R. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Curr Med Chem*, v. 19, p. 3794-3804, 2012.

- BOYKEN S.E., CHEN Z., GROVES B., LANGAN R.A., OBERDORFER G., FORD A., GILMORE J.M., XU C., DIMAIO F., PEREIRA J.H., SANKARAN B., SEELIG G., ZWART P.H., BAKER D. De novo design of protein homo-oligomers with modular hydrogen-bond network-mediated specificity. *Science* v. 352, n. 6286, p. 680–687, 2016.
- BUKRINSKAYA A., BRICHACEK B., MANN A., STEVENSON M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med*, v. 188, n. 11, p. 2113-2125, 1998.
- CALDERON L.A. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-19, 2014.
- CARTHEW R.W., SONTHEIMER E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, n.4, p. 642-55, 2009.
- CASANOVA I., UNZUETA I., ARROYO-SOLERA I., CÉSPEDES M.V., VILLAVERDE A., MANGUES R. E VAZQUES E. Protein-driven nanomedicines in oncotherapy. *Current Opinion in Pharmacology*, v.47, p. 1-7, 2019.
- CHAIKAKUL J., HODGSON W.C., KURUPPU S., PRASONGSOOK N. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. *J Cancer*, v. 7, n.11, p. 1571-1578, 2016.
- Chen H., Niu G., Wu H., Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha v \beta 3$. *Journal Theranostics*, v. 6, n.1, p.78-92, 2016.
- CORCHERO J.L., VAZQUEZ E., GARCIA-FRUITOS E., FERRER-MIRALLES N., VILLAVERDE A. Recombinant protein materials for bioengineering and nanomedicine. *Nanomedicine Lond*, v. 9, n.18, p. 2817–2828, 2014.
- DE PAULA L., SILVA C.L., CARLOS D., MATIAS-PERES C., SORGI C.A., SOARES E.G., SOUZA P.R., BLADÉS C.R., GALLETI F.C., BONATO V.L., GONÇALVES E.D., SILVA E.V., FACCIOLI L.H. Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genet Vaccines Ther*, v.5, n.2, 2007.
- DÍAZ R., PALLARÈS V., CANO-GARRIDO O., SERNA N., SÁNCHEZ-GARCÍA L., FALGÀS A., PESARRODONA M., UNZUETA U., SÁNCHEZ-CHARDI A., SÁNCHEZ J.M., CASANOVA I., VÁZQUEZ E., MANGUES R., VILLAVERDE A.

Selective CXCR4+ Cancer Cell Targeting and Potent Antineoplastic Effect by a Nanostructured Version of Recombinant Ricin. *Small*, 14. In press, 2018.

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

DUAN, J., LIANG, S., FENG, L., YU, Y., SUN, Z. Silica nanoparticles trigger hepatic lipid-metabolism disorder in vivo and in vitro. *Internacional Journal of nanomedicine*, v.13, p. 7303 – 7318, 2018.

ELBASHIR, S.M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, v.411, p. 494–498, 2001.

ENYEDI K.N., TÓTH S., SZAKÁCS G., E MEZŐ G. NGR-peptide–drug conjugates with dual targeting properties. *PLoS One*, v. 12, 2017.

FALLAS J.A., UEDA G., SHEFFLER W., NGUYEN V., MCNAMARA D.E., SANKARAN B., PEREIRA J.H., PARMEGGIANI F., BRUNETTE T.J., CASCIO D., YEATES T.R., ZWART P., BAKER D. Computational design of self-assembling cyclic protein homo-oligomers. *Nat. Chem*, v. 9, n.4, p. 353–360, 2017.

FANCIULLINO, R., CICCOLINI, J., MILANO, G. Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: A focus on nano-albumin-bound drugs. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, v. 88, p. 504–513, 2013.

FAVARO M.T.P, TOLEDO M.A.S., ALVES R.F., SANTOS C.A., BELOTI L.L., SOUZA A.P., AZZONI A.R. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. *Journal of Biotechnology*, v. 173 p. 10-18, 2014.

FAVARO M.T.P., UNZUETA U., DE CABO M., VILLAVERDE A., FERRER-MIRALLES N., AZZONI A.R. Intracellular trafficking of a dynein-based nanoparticle designed for gene delivery. *European J. Pharm. Sciences*, v. 112, p. 71-78, 2018a.

FAVARO M.T.P., SERNA N., SÁNCHEZ-GARCÍA L., CUBARSI R., ROLDÁN M., SÁNCHEZ-CHARDI A., UNZUETA U., MANGUES R., FERRER-MIRALLES N., AZZONI A.R., VÁZQUEZ E., VILLAVERDE A. Switching cell penetrating and

- CXCR4-binding activities of nanoscale-organized arginine-rich peptides. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 14, p. 1777-1786, 2018b.
- FAVARO, M.T.P., SÁNCHEZ-GARCIA, L., ROLDÁN M., UNZUETA U., SERNA N., CANO-GARRIDO O., AZZONI A.R., FERRER-MIRALLES N., VILLAVERDE A., Vázquez E. Protein nanoparticles are nontoxic, tuneable cell stressors. *Nanomedicine*, v. 13, p. 255-268, 2018c.
- FERRER-MIRALLES N., RODRIGUEZ-CARMONA E., CORCHERO J.L., GARCIA-FRUITOS E., VAZQUEZ E., VILLAVERDE A. Engineering protein self-assembling in protein-based nanomedicines for drug delivery and gene therapy. *Crit. Rev. Biotechnol*, v.35, n.2, p. 209–221, 2015.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS S.A., DRIVER S.E., MELLO C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v.391, p.806-11, 1998.
- FLORCZAK, A., MACKIEWICZ, A., DAMS-KOZLOWSKA, H. Cellular uptake, intracellular distribution and degradation of Her2-targeting silk nanospheres. *International Journal of nanomedicine*, v. 14, p. 6855 – 6865, 2019.
- FRIEDMANN, T. The road toward human gene therapy--a 25-year perspective. *Ann Med.*, v.29, n.6, p.575-7, 1997.
- FOROOZANDEH, P., AZIZ, A. A. Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, v. 13, 2018.
- GAGEN D., FILLA M.S., CLARK R., LITON P., PETERS D.M. Activated avb3 Integrin Regulates avb5 Integrin–Mediated Phagocytosis in Trabecular Meshwork Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 54, n.07, 2013.
- GARY, D.J., PURI, N., WON, Y.-Y. Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 121, p. 64–73, 2007.
- GASTON J., MAESTRALI N., LALLE G., GAGNAIRE M., MASIERO A., DUMAS B., BERNE P.-F. Intracellular delivery of therapeutic antibodies into specific cells using antibody-peptide fusions. *Scientific Reports*, v. 9, n.1, 2019.
- GELBAND H., SANKARANARAYANAN R., GAUVREAU C.L., HORTON S., ANDERSON B.O., BRAY F., CLEARY J., DARE A.J., DENNY L.,

- GOSPODAROWICZ M.K., GUPTA S., HOWARD S.C., JAFFRAY D.A., KNAUL F., LEVIN C., RABENECK L., RAJARAMAN P., SULLIVAN T., TRIMBLE E.L., JHA P. Costs, affordability, and feasibility of an essential package of cancer control interventions in low-income and middle-income countries: key messages from Disease Control Priorities, 3rd edition. *Lancet*, v. 387, p. 2133- 2144, 2016.
- GERSTEN O., WILMOTH J.R. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res*, v. 7, p. 271- 306, 2002.
- GUO C., WANG J., JING L., MA R., LIU X., GAO L., SUN Z. Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles. *Environ Pollut*, v. 236, p. 926 – 936, 2018.
- HILL, A.B., CHEN, M., CHEN, C.-K., PFEIFER, B.A., JONES, C.H. Overcoming Gene-Delivery Hurdles: Physiological Considerations for Nonviral Vectors. *Trends in Biotechnology*, v. 34, p. 91–105, 2016.
- HUANG T.F. What have snakes taught us about integrins? *Cell Mol Life Sci*, v. 54, n.6, p. 527-540, 1998.
- HUANG T.F., YEH C.H., WU W.B. Viper venom components affecting angiogenesis. *Haemostasis*, v. 31, n. 3, p. 192-206, 2001.
- HUANG Y., WANG X., HUANG W., CHENG Q., ZHENG S., GUO S., CAO H., LIANG X.J., DU Q., LIANG Z. Systemic Administration of siRNA via cRGD-containing Peptide. *Sci Rep*, v. 24, n. 5, 12458, 2015.
- JACKSON D. A., SYMONS R. H., BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.69, n.10, p. 2904-9, 1972.
- JANIB S.M., GUSTAFSON J.A., MINEA R.O., SWENSON S.D., LIU S., PASTUSZKA M.K., LOCK L.L., CUI H., MARKLAND F.S., CONTI P.S., LI Z, MACKAY J.A. Multimeric disintegrin protein polymer fusions that target tumor vasculature. *Biomacromolecules*, v. 15, n.7, p. 2347-58, 2014.

- JONES, C.H., HAKANSSON, A.P., PFEIFER, B.A. Biomaterials at the interface of nano- and micro-scale vector: cellular interactions in genetic vaccine design. *Journal of Materials Chemistry B*, v.2, p. 8053–8068, 2014.
- KHAN K.H. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*, v. 3, n. 1, p. 26-35, 2013.
- KUTZLER, M.A., WEINER, D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews in Genetics*, v. 9, p. 776–788, 2008.
- LEOPOLD P.L., PFISTER K.K. Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic*, v. 7, n. 5, p. 516-523, 2006.
- LINDEN, R. Genes contra doenças. Terapia gênica: uma nova era na genética. Rio de Janeiro: Vieira e Lent, p.128, 2008.
- LIMA-DOS-SANTOS, I., DELLA-CASA, M.S., PORTES-JUNIOR, J. A., CALABRIA, P.A.L., MAGALHÃES, G.S., MOURA-DA-SILVA, A.M. Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from *Bothrops neuwiedi* venom gland with distinct cysteine pattern. *Toxicon*, v. 104, p. 57–64, 2015.
- LI-LI C., PING L., XI L., XUAN H., YI-QING Y., FENG-YING C., HONG Y., FU-QIANG H., YONG-ZHONG D. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin-overexpressing tumor cells. *Int J Nanomedicine*, v. 6, p. 3499–3508, 2011.
- LI, L., SAADE, F., PETROVSKY, N. The future of human DNA vaccines. *Journal of Biotechnology*, v. 162, p. 171–182, 2012.
- LÓPEZ-LAGUNA H., CUBARSI R., UNZUETA U., MANGUES R., VÁZQUEZ E., VILLAVARDE A. Endosomal escape of protein nanoparticles engineered through humanized histidine-rich peptides. *Science China Materials*, p. 1-10, 2019.
- LU R.-M., HWANG Y.-C., LIU I.-J., LEE C.-C., TSAI H.-Z., LI H.-J., WU H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, v. 27, n.1, 2020.
- MAHMOODI CHALBATANI G., DANA H., GHARAGOUZLOO E., GRIJALVO S., ERITJA R., LOGSDON C.D., MEMARI F., MIRI S.R., RAD M.R., MARMARI V. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. *Int J Nanomedicine*, v. 14, p. 3111-3128, 2019.

- MCCORMICK, F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?. *Nat Rev Cancer*, v. 1, p. 130-141, 2001.
- MCLANE M.A., JOERGER T., MAHMOUD A. Disintegrins in health and disease. *Front Biosci*, v. 13, p, 6617-6637, 2008.
- MAITANI Y., IGARASHI S., SATO M., HATTORI Y. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *Int J Pharm*, v. 342, p. 33-39, 2007.
- MANGUES R.V.E., VILLAVERDE A. Targeting in Cancer Therapies. *Med Sci*, v. 4, p. 6, 2016.
- MASTROBATTISTA E., VAN DER AA M.A., HENNINK W.E., CROMMELIN D.J. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 2, p. 115-121, 2006.
- MEISTER, G., TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v.,431, p. 343–349, 2004.
- MESIKA A., KISS V., BRUMFELD V., GHOSH G., REICH Z. Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum Gene Ther*, v. 16, n. 2, p. 200-208, 2005.
- MOROZOVA, O.V., SOKOLOVA, A.I., PAVLOVA, E.R., ISAEVA, E.I., OBRAZTSOVA, E.A., IVLEVA, E.A., KLINOV, D.V. Protein nanoparticles: Cellular uptake, intracellular distribution, biodegradation and induction of cytokine gene expression. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2020.
- MOSELEY G.W., ROTH D.M., DEJESUS M.A., LEYTON D.L., FILMER R.P., POUTON C.W., JANS D.A. Dynein light chain association sequences can facilitate nuclear protein import. *Mol Biol Cell*, v. 18, n. 8, p. 3204-3213, 2007.
- MONTENEGRO C.F., SALLA-PONTES C.L., RIBEIRO J.U., MACHADO A.Z., RAMOS R.F., FIGUEIREDO C.C., MORANDI V., SELISTRE-DE-ARAUJO H.S. Blocking avb3 integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*, v. 94; 1812-1820. 2012.
- MOSQUERA, J., GARCÍA, I., LIZ-MARZÁN, L. M. Cellular uptake of nanoparticles versus small molecules: a matter of size. *Acc Chem Res*, v. 51, p. 2305-2313, 2018.

- MÜLLER K., NAHDE T., FAHR A., MÜLLER R., BRÜSSELBACH S. Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles. *Cancer Gene Ther*, v. 8, n. 2, p.107-17, 2001.
- NAROA S., CÉSPEDES M.V., SÁNCHEZ-GARCÍA L., UNZUETA U., SALA R., SÁNCHEZ-CHARDI A., CORTÉS F., FERRER-MIRALLES N., MANGUES R., VÁZQUEZ E., VILLAVERDE A. Peptide-based nanostructured materials with intrinsic proapoptotic activities in CXCR4+ solid tumors. *Adv. Funct. Mater* v. 27, n. 32, 2017.
- NIMESH S., AGGARWAL A., KUMAR P., SINGH Y., GUPTA K.C., CHANDRA R. Influence of acyl chain length on transfection mediated by acylated PEI nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 337, n. 1-2, p. 265-74, 2007.
- NITIN N., LACONTE L., RHEE W.J., BAO G. TAT peptide is capable of importing large nanoparticles across nuclear membrane in digitonin permeabilized cells. *Ann Biomed Eng*, v. 37, n. 10, p. 2018-2027, 2009.
- NOH, S. H., KIM, W-K., KIM, S.J., KIM, J.M., BAEK, K.-H., OH, Y.-K. Enhanced cellular delivery and transfection efficiency of plasmid DNA using positively charged biocompatible colloidal gold nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 747–752, 2007.
- OGAWA-GOTO K., TANAKA K., GIBSON W., MORIISHI E., MIURA Y., KURATA T., IRIE S., SATA T. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol*, v. 77, n. 15, p. 8541-8547, 2003.
- OMRAN A.R. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*, v. 49, p. 509- 538, 1971.
- OW SULLIVAN M.M., GREEN J. J., PRZYBYCIEN T. M. Development of a novel gene delivery scaffold utilizing colloidal gold–polyethylenimine conjugates for DNA condensation. *Gene Therapy*, v. 10, p. 1882–1890, 2003.
- PAREJO B, STUPP R, RÜEGG C. Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? *Review Cancers*, v.11, n.7, p.978, 2019.
- PENFOLD M.E., ARMATI P., Cunningham A.L. Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci EUA*, v. 91, n. 14, p. 6529-6533, 1994.

- PEPIC I., HAFNER A., LOVRIC J., PERINA LAKOS G. Nanotherapeutics in the EU an overview on current state and future directions. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1005, n. 2001, 2014
- PESARRODONA M., FERRER-MIRALLES N., UNZUETA U., GENER P., TATKIEWICZ W., ABASOLO I., RATERA I., VECIANA J., SCHWARTZ S. J., VILLAVERDE A., VAZQUEZ E. Intracellular targeting of CD44+ cells with self-assembling, protein only nanoparticles. *Int. J. Pharm*, v. 473, n. 1–2, p. 286–295, 2014.
- PFISTER K.K., SHAH P.R., HUMMERICH H., RUSS A., COTTON J., ANNUAR A.A., KING S.M., FISHER E.M. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet*, v. 2, n. 1, 2006.
- PILLAI, G. Nanotechnology Toward Treating Cancer: A Comprehensive Review. Cap 9. Nano science and Nanotechnology in Drug Delivery, p. 221-2256, 2019.
- REISCHL D, ZIMMER A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*, v. 5, n.1, p. 8-20, 2009.
- RIVAS-MERCADO E.A., GARZA-OCAÑAS L. Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. *Medicina Universitaria*, v. 19, n. 74, p. 32-37, 2017.
- ROSADA R.S., DE LA TORRE L.G., FRANTZ F.G., TROMBONE A.P., ZÁRATE-BLADÉS C.R., FONSECA D.M., SOUZA P.R., BRANDÃO I.T., MASSON A.P., SOARES E.G., RAMOS S.G., FACCIOLI L.H., SILVA C.L., SANTANA M.H., COELHO-CASTELO A.A. Protection Against Tuberculosis by a Single Intranasal Administration of DNA-hsp65 Vaccine Complexed with Cationic Liposomes. *BMC Immunology*, p. 9-38, 2008.
- RUEDA F., CÉSPEDES M.V., CONCHILLO-SOLÉ O., SÁNCHEZ-CHARDI A., SERAS-FRANZOSO J., CUBARSI R., GALLARDO A., PESARRODONA M., FERRER-MIRALLES N., DAURA X., VÁZQUEZ E., GARCÍA-FRUITÓS E., MANGUES R., UNZUETA U., VILLAVERDE A. Bottom-up instructive quality control in the biofabrication of smart protein materials. *Adv. Mater*, v.27, n.47, p.7816–7822, 2015.

- SÁNCHEZ-GARCÍA L, SERNA N., ÁLAMO P., SALA R., CÉSPEDES M.V., ROLDAN M., SÁNCHEZ-CHARDI A., UNZUETA U., CASANOVA I., MANGUES R., VÁZQUEZ E., VILLAVERDE A. Self-assembling toxin-based nanoparticles as self-delivered antitumoral drugs. *J Control Release*, v. 274 p. 81-92, 2018.
- SERNA N., SÁNCHEZ-GARCÍA L., SÁNCHEZ-CHARDI A., UNZUETA U., ROLDÁN M., MANGUES R., VÁZQUEZ E., VILLAVERDE A. Protein-only, antimicrobial peptide-containing recombinant nanoparticles with inherent built-in antibacterial activity. *Acta Biomater*, v. 60, p. 256–263, 2017.
- SERNA N., CÉSPEDES M.V., SACCARDO P., XU Z., UNZUETA U., ÁLAMO P., PESARRODONA M., SÁNCHEZ-CHARDI A., ROLDÁN M., MANGUES R., VÁZQUEZ E., VILLAVERDE A., FERRER-MIRALLES N. Rational engineering of single-chain polypeptides into protein-only, BBB-targeted nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 12, n.5, p. 1241–1251, 2016.
- SERNA N., SÁNCHEZ-GARCÍA L., UNZUETA U., DÍAZ R., VÁZQUEZ E., MANGUES R., VILLAVERDE A. Protein-Based Therapeutic Killing for Cancer Therapies. *Trends Biotechnol*, v. 36, n.3, p. 318-335, 2018.
- SILVA et al. Agentes antitumorais inibidores de angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta3$. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian. Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 43, n. 1, 2007.
- SIQUEIRA, R.A.G.B., CALABRIA, P.A.I., CAPORRINO, M.C., TAVORA, B.C.L.F., BARBARO, K.C., FAQUIM-MAURO, E.L., DELLA-CASA, M.S., MAGALHÃES, G.S. When spider and snake get along: Fusion of a snake disintegrin with a spider phospholipase D to explore their synergistic effects on a tumor cell. *Toxicon*, v. 168, p. 40-48, 2019.
- SUOMALAINEN M., NAKANO M.Y., KELLER S., BOUCKE K., STIDWILL R.P., GREBER U.F. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol*, v. 144, n. 4, p. 657-672, 1999.
- SWENSON S., COSTA F., MINEA R., SHERWIN R.P., ERNEST W., FUJI G., YANG D., MARKLAND F.S. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol Cancer Ther*, v. 3, n 4, p. 499-511, 2004.

- TOLEDO, M.A.S., JANISSEN, R., FAVARO, M.T.P., COTTA, M.A., MONTEIRO, G.A., PRAZERES, D.M.F., SOUZA, A. P., AZZONI, A. R. Development of a Recombinant Fusion Protein Based on the Dynein Light Chain LC8 for Non-viral Gene Delivery. *Journal of Controlled Release* v. 159, p. 222-231, 2012.
- TOLEDO M.A.S, FAVARO M.T.P., ALVES R. F., SANTOS C.A., BELOTI L.L., CRUCCELLO A., SANTIAGO A.S., MENDES J.S., APARICIO R., SOUZA A.P., AZZONI, A.R. Characterization of the human Dynein light chain Rp3 and its use as a non-viral gene delivery vector. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 3591-3602, 2014.
- TSENG Y.C., MOZUMDAR S., HUANG L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 61, n.9, p. 721-31, 2009.
- TZFIRA T. On tracks and locomotives: the long route of DNA to the nucleus. *Trends Microbiol*, v. 14, n. 2, p. 61-63, 2006.
- UNZUETA U., CÉSPEDES M.V., FERRER-MIRALLES N., DOMINGO-ESPÍN J., VILLAVERDE A., VÁZQUEZ E. Intracellular CXCR4+ cell targeting with T22-empowered protein-only nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. v. 7, p. 4533-4544, 2012.
- UNZUETA U., CÉSPEDES M.V., VAZQUEZ, E., FERRER-MIRALLES N., MANGUES R., VILLAVERDE A. Towards protein-based viral mimetics for cancer therapies. *Trends in Biotechnology*, v. 33, p. 253–258, 2015.
- VAZQUEZ E., FERRER-MIRALLES N., MANGUES R., CORCHERO J.L., SCHWARTZ S. J.R., VILLAVERDE A. Modular protein engineering in emerging cancer therapies. *Curr Pharm Des*, v. 15, p. 893-916, 2009.
- VAZQUEZ, E., FERRER-MIRALLES, N., VILLAVERDE, A, Peptide-assisted traffic engineering for nonviral gene therapy. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 1067–1074, 2008.
- VAZQUEZ E., MANGUES R., VILLAVERDE A. Functional recruitment for drug delivery through protein-based nanotechnologies. *Nanomedicine*, v. 11, n. 11, p.1333–1336, 2016.
- VAZQUEZ E., VILLAVERDE A. Engineering building blocks for self-assembling protein nanoparticles. *Microbial Cell Factories*, v. 9, n. 101, 2010.

- VELLAI, T., VIDA, G. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. Biol. Sci.*, v. 266, n. 1428, p. 1571-7, 1999.
- VOLTÀ-DURÁN E., SÁNCHEZ J.M., PARLADÉ E., SERNA N., VAZQUEZ E., UNZUETA U., VILLAVERDE A. The Diphtheria Toxin Translocation Domain Impairs Receptor Selectivity in Cancer Cell-Targeted Protein Nanoparticles. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 12, p.2644, 2022.
- WATSON, J. D. et al. *Recombinant DNA: genes and genomics: a short course*. S. I.: Freeman, 474p, 2006.
- WICKI A., WITZIGMANN, D., BALASUBRAMANIAN, V., HUWYLER, J. *Journal of Controlled Release*. *Journal of Controlled Release*, n.200, p. 138–157, 2015.
- WIRTH, T., PARKER, N., YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. *Gene*, v. 525, p.162–169, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019*. WHO; 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>>, Acesso em: 11 de dezembro de 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). ‘Best buys’ and other recommended interventions for the prevention and control of noncommunicable diseases: updated Appendix 3 of the Global Action Plan for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases 2013-2020. WHO; 2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/259232>>, Acesso em: 25 de novembro de 2020.
- XIONG J.P., STEHLE T., ZHANG R., JOACHIMIAK A., FRECH M., GOODMAN S.L., Arnaout M.A. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin α V β 3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science*, v. 296, n.151, 2002.
- YEATES T.O. Geometric principles for designing highly symmetric self-assembling protein nanomaterials. *Annu. Rev. Biophys*, v. 46, p. 23–42 , 2017.
- YEATES T.O., LIU Y., LANIADO J. The design of symmetric protein nanomaterials comes of age in theory and practice. *Curr. Opin. Struct. Biol*, v. 39, p. 134–143, 2016.
- YEATES T.O., PADILLA J.E. Designing supramolecular protein assemblies. *Curr. Opin. Struct. Biol*, v. 12, n.4, p. 464–470, 2002.

ZABNER J., FASBENDER A.J., MONINGER T., POELLINGER K.A., WELSH M.J.

Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, v. 270, n. 32, p. 18997-19007, 1995.

ZHUANG J.J., HUNTER C.P. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: uptake,

mechanism, and regulation. *Parasitology*, v. 139, n. 5, p. 560-73, 2012.