



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE QUITOSANA COMO AGENTES DE
TRANSFECCÃO PARA TRANSFERÊNCIA GÊNICA NÃO VIRAL**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2013

ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE QUITOSANA COMO AGENTES DE
TRANSFECCÃO PARA TRANSFERÊNCIA GÊNICA NÃO VIRAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2013

Picola, Isadora Pfeifer Dalla,

Aplicação de derivados de quitosana como agentes de transfecção para transferência gênica não viral / Isadora Pfeifer Dalla Picola. -- São José do Rio Preto, 2013

136 f. : il., tabs.

Orientador: Marcio José Tiera

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Quitosana. 4. Terapia gênica. 5. Técnicas de transferência gênica. 6. Vetores genéticos. I. Tiera, Marcio José. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE QUITOSANA COMO AGENTES DE
TRANSFECCÃO PARA TRANSFERÊNCIA GÊNICA NÃO VIRAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcio José Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho
USP – São Carlos

Prof. Dr. Sang Won Han
UNIFESP – São Paulo

Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – São José do Rio Preto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

13/SETEMBRO/2013

Comissão Julgadora

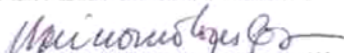
Titulares



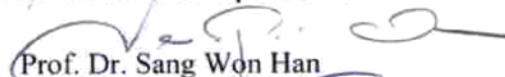
Prof. Dr. Marcio José Tiera



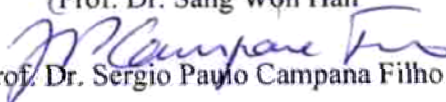
Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa



Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio



Prof. Dr. Sang Won Han



Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

13/SETEMBRO/2013

Agradecimentos

Muitos contribuíram, de uma forma ou de outra, na realização desse trabalho, a quem apresento aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcio José Tiera, pela orientação, amizade, paciência, respeito, confiança, oportunidades, ensinamentos, discussões e por todo o engrandecimento na minha formação, desde a iniciação científica até a conclusão do doutorado;

Ao Prof. Dr. Júlio C. Fernandes, pela orientação, discussões, ensinamentos e oportunidade de estágio de doutorado em seu laboratório do Centro de Pesquisa do Hospital do Sacré-Coeur de Montreal;

À Dra. Qin Shi e ao Dr. Mohamed Benderdour, pela ajuda, discussões e também nos momentos de descontração no período em que trabalhei no Centro de Pesquisa do Hospital do Sacré-Coeur de Montreal;

À Profa. Dra. Vera Tiera, pelos ensinamentos, discussões, ajuda e amizade;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Física do Ibilce por todos os ensinamentos e ajuda durante o curso de doutorado;

Aos alunos e colegas da pós-graduação em Biofísica Molecular do Ibilce, em especial ao Marcelo, Natália e Gabriel, pela amizade;

A todos os colegas do laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia que fazem desse um maravilhoso ambiente de trabalho. Entre esses, Hellen, Bruno, Juliana e Richard pela ajuda, conversas e discussões;

A todos da Seção de pós-graduação, em especial à Rosemar Brena e à Silvia Emiko, pelo excelente atendimento, ajuda e eficiência na solução de problemas de documentação;

A todas as minhas amigas de Montreal, em especial à Andrea, Camilla e Talita, que sempre estiveram presentes em momentos de descontração, discussões muito bem vindas e que me proporcionaram uma vida no Canadá mais brasileira e alegre;

Aos meus queridos avós, Paulina Biacchi Pfeifer e Eduardo Marques Pfeifer, que sempre foram presentes, com amor, carinho e atenção, mesmo à distância;

À minha mãe, Rejane Biacchi Pfeifer, e irmã, Jéssica Pfeifer Dalla Picola, pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo, dedicação e por fazerem de mim uma pessoa cada vez melhor;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro no estágio de doutorado no exterior em Montreal (Processo BEX: 4847/10-5).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro em toda minha formação acadêmica, na iniciação científica (Processo n° 2006/04635-7), no mestrado (Processo n° 2007/06066-2) e no doutorado (Processo n° 2010/09651-6).

Finalmente, um agradecimento àqueles que, mesmo não citados (familiares e amigos), estiveram presentes em alguns momentos e que deram sua contribuição para o meu engrandecimento como pessoa.

Resumo

Uma possível estratégia para aumentar a eficiência de transfecção gênica da quitosana como vetor não viral é a modificação desse polícatión com adição de grupos hidrofílicos, sensíveis ao pH e seletivos quanto às células alvo, sem interferir nas propriedades biológicas da quitosana, como biodegradabilidade e baixa toxicidade. Nesse tema, a presente tese teve como objetivo a modificação da estrutura da quitosana com grupos fosforilcolina (PC), dietilaminoetila (DEAE) e o ligante folato (FA). Derivados de quitosana com diferentes proporções de grupos PC e DEAE foram sintetizados e caracterizados utilizando-se RMN de ^1H , titulação condutimétrica, Cromatografia de permeação em gel e espectroscopia UV-vis. Os derivados foram utilizados para a preparação de poliplexos com o plasmídeo VR1412 e com o RNA de interferência siRNA-SSB. Esses poliplexos preparados foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico, obtendo-se nanopartículas (NPs) cujos diâmetros variaram de 100 nm a 700 nm, e com valores de potencial zeta de -25 mV a +22 mV, dependentes dos graus de substituição de PC e DEAE. A estabilidade das partículas e a integridade do plasmídeo foram verificadas a partir de eletroforese em gel de agarose, observando-se maior estabilidade para maiores razões N/P (N = grupos amina do polícatión; P = grupos fosfato do pDNA ou siRNA), e para os polímeros de maior massa molecular e substituídos com o grupo DEAE. Células HeLa foram utilizadas para analisar a citotoxicidade dos poliplexos e polímeros, bem como a eficiência de transfecção. Os resultados mostraram que a citotoxicidade dos derivados aumenta com o grau de substituição por DEAE. Entretanto, a composição pode ser controlada e todos os derivados foram menos tóxicos que o lipídeo comercial lipofetamina, lipídeo geralmente utilizado para transferência gênica. A eficiência de transfecção foi altamente intensificada com as modificações feitas, chegando a resultados muito próximos aos obtidos com a lipofetamina. Com isso, demonstra-se que modificações na estrutura de quitosana é uma alternativa promissora para aumentar a eficiência de transfecção e para o desenvolvimento de vetores não virais eficientes para a terapia gênica.

PALAVRAS-CHAVE: Quitosana, transferência gênica, vetor não viral, dietilaminoetila, fosforilcolina, ácido fólico.

Abstract

One possible strategy to improve the efficiency of chitosan as a non viral vector is the modification on the polycation with the additions of hydrophilic, pH-sensitive and selective groups for the target cells, without interfering with the biological properties of chitosan, such as biodegradability and low toxicity. On this matter, the present thesis aimed the modification on the structure of chitosan, with phosphorylcholine (PC), diethylaminoethyl (DEAE) and the ligand folate (FA). Chitosan derivatives with different proportions of PC and DEAE groups were synthesized and characterized using ¹H-NMR, conductimetric titration, gel permeation chromatography and UV-vis spectroscopy. The derivatives were used to prepare polyplexes with plasmid VRI412 and small interference RNA, siRNA-SSB. The particles were characterized by dynamic light scattering, resulting in nanoparticles with diameters ranging from 100 nm to 700 nm, and the zeta potential values from -25 mV to +22 mV dependent on the degree of substitution of PC and DEAE. The colloidal stability of these particles and integrity of the plasmid were verified with agarose gel electrophoresis, observing improved stability with higher N/P ratio (N = amine groups from polycation / P = phosphate groups from pDNA or siRNA), molecular weight of polymers and substitution of DEAE group. HeLa cells were used to analyze the cytotoxicity of polyplexes and polymers, as well as the transfection efficiency. The results showed that the cytotoxicity of the derivatives increases with the degree of substitution of DEAE. However, the composition can be controlled, and all the derivatives were less toxic than lipofectamine, a general commercial lipid used for gene transfer. Transfection efficiency was highly enhanced with the modifications, arriving to eight times more efficient than unmodified deacetylated chitosan and very close to the results observed for lipofectamine. The results evidenced that changes on the structure of chitosan is a promising alternative to improve transfection efficiency and the development of efficient non-viral vectors for gene therapy.

KEYWORDS: Chitosan, gene transfer, non-viral vector, diethylaminoethyl, phosphorylcholine, folic acid.

Sumário

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	XVIII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2. TERAPIA GÊNICA	3
1.2.1. Vetores virais	4
1.2.2. Vetores não virais	4
1.2.2.1. <i>Plasmídeos</i>	5
1.2.2.2. <i>Lipídeos catiônicos</i>	5
1.2.2.3. <i>Polímeros catiônicos</i>	7
A) Poli-L-lisina (PLL)	9
B) Polietilenimina (PEI)	10
C) Metacrilato de poli-2-dimetilaminoetila (PDMAEMA)	12
1.3. QUITOSANA	13
1.3.1. Grau de Desacetilação (GD)	16
1.3.2. Massa Molecular	17
1.3.3. Quitosanas Modificadas	19
1.3.3.1. <i>Modificações hidrofílicas</i>	19
1.3.3.2. <i>Grupos sensíveis ao pH</i>	21
1.3.3.3. <i>Grupos seletivos</i>	23
1.4. ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE QUITOSANA COMO UM VETOR NÃO VIRAL EFICIENTE	25
1.5. OBJETIVOS	27
CAPÍTULO 2	29
MATERIAIS E MÉTODOS	29

2.1. MATERIAIS	29
2.2. INSTRUMENTAÇÃO	30
2.3. MÉTODOS	30
2.3.1. Desacetilação e degradação da quitosana	30
2.3.2. Preparo de quitosanas substituídas com fosforilcolina (PC)	31
2.3.3. Preparo de quitosanas substituídas com dietilaminoetila (DEAE)	31
2.3.4. Síntese das quitosanas contendo o ligante ácido fólico	32
2.3.5. Caracterização dos polímeros	33
2.3.5.1. <i>Determinação do grau de substituição por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio</i>	33
2.3.5.2. <i>Determinação da massa molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC).</i>	34
2.3.5.3. <i>Determinação da capacidade de tamponamento.</i>	34
2.3.6. Amplificação e purificação do DNA de plasmídeo VR1412	34
2.3.7. Formação de Poliplexos	35
2.3.8. O tamanho das partículas e potencial zeta	35
2.3.9. Eletroforese em gel de agarose e verificação da integridade do plasmídeo	36
2.3.10. Citotoxicidade	36
2.3.10.1. <i>Polímeros:</i>	36
2.3.10.2. <i>Poliplexos:</i>	37
2.3.11. Eficiência de transfecção	37
2.3.11.1. <i>Estudo de Transfecção pelo plasmídeo VR1412</i>	37
2.3.11.2. <i>Transfecção pelo siRNA-SSB</i>	38
CAPÍTULO 3	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	40
3.2. ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS COM O PLASMÍDEO VR1412	46
3.2.1. Tamanho e potencial zeta	47
3.2.2. Eletroforese	52
3.3. ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS COM O RNA DE INTERFERÊNCIA.	57
3.3.1. Tamanho e potencial zeta	57
3.3.2. Eletroforese	60
3.4. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	63
3.4.1. Citotoxicidade da Quitosana e seus Derivados	63
3.4.2. Citotoxicidade dos Poliplexos Preparados com pDNA VR 1412	65
3.4.3. Citotoxicidade dos Poliplexos Preparados com o RNA de interferência.	68

3.5. EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO	70
3.5.1. Plasmídeo VR1412 (β -gal)	70
3.5.2. Eficiência do Processo de Supressão pelo RNA de interferência	76
<u>CAPÍTULO 4</u>	80
CONCLUSÕES	80
<u>REFERÊNCIAS</u>	82
<u>APÊNDICE A</u>	95
<u>APÊNDICE B</u>	105

Índice de Figuras

Figura 1. Plasmídeo com os genes de resistência a antibióticos, origem de replicação e os sítios de restrição, onde o gene de interesse pode ser inserido.....	5
Figura 2. Lipídeo catiônico (a) e lipoplexo (b).....	6
Figura 3. Interação entre os polieletrólitos, DNA e policátions, na formação de poliplexos.	7
Figura 4. Representação hipotética de “esponja de prótons”. a) Interação eletrostática e formação de poliplexos. b) Reconhecimento do ligante pelos receptores celulares da membrana. c) Entrada do poliplexo por meio de endocitose. d) Hipótese de esponja de prótons e liberação dos polieletrólitos no meio citoplasmático. f) Entrada do pDNA livre no núcleo. g) Síntese da proteína. h) Liberação do siRNA e interação com o complexo de indução de silenciamento do RNA (RISC). i) Reconhecimento do mRNA e sua degradação.	8
Figura 5. Estrutura do aminoácido L-lisina e da poli-L-lisina.....	9
Figura 6. Estrutura da polietilenimina linear e ramificada.	11
Figura 7. Estrutura do metacrilato de dimetilaminoetila (a) e do polímero PDEAEMA (b)....	12
Figura 8. Estrutura da quitina.....	14
Figura 9. Reação de desacetilação da quitina para obtenção de quitosana.	15
Figura 10. Modificação de quitosana com fosforilcolina (PC).....	21
Figura 11. Síntese de derivados de quitosana contendo DEAE.....	23
Figura 12. Diagrama com as estratégias para obtenção de quitosanas efetivas como vetores não virais para terapia gênica.	26
Figura 13. Estrutura do ácido fólico e do polietileno glicol heterobifuncional.	33
Figura 14. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos derivados de quitosana da série I ($\text{PC}_x\text{-CH-DEAE}_y$) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (100/1, v/v) a 70°C	42
Figura 15. Capacidades de tamponamento dos derivados da série I em função do pH.	45
Figura 16. Diâmetros hidrodinâmicos dos poliplexos de plasmídeo formados com os polímeros da série I em a) pH 6,3 e b) pH 7,4. Os valores correspondem as médias de duas preparações independentes, com três medidas consecutivas cada.	48
Figura 17. Potenciais zeta dos poliplexos de plasmídeo formados com os derivados da série I em a) pH 6,3 e b) pH 7,4.	49

- Figura 18. a) Diâmetros hidrodinâmicos e b) potencial zeta dos poliplexos de plasmídeo formados com polímeros da série II em pH 5,0. 50
- Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico dos poliplexos de plasmídeos formados com derivados da série I (a) e da série II (b) em pH 7,4 e em função do tempo em minutos. 52
- Figura 20. Eletroforeses dos poliplexos preparados com plasmídeo VR1412 e (a) PC₁₈-CH, (b) PC₁₈-CH-DEAE₂₂, (c) PC₁₈-CH-DEAE₃₈ e (d) PC₁₈-CH-DEAE₄₄ em pH 6,3. (e) eletroforese dos poliplexos preparados com CH12-PC₁₈ após a digestão com lisozima e quitosana no mesmo pH. As razões N/P são indicadas acima de cada poço, Ld = Ladder, DNA = plasmídeo livre. (f) eletroforese de 1 kb ladder com os marcadores de peso molecular e do plasmídeo VR1412. 53
- Figura 21. Eletroforeses dos poliplexos preparados com Plasmídeo VR1412 e (a) PC₁₈-CH, (b) PC₁₈-CH-DEAE₄₄, (c) PC₂₀-CH and (d) PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4. As razões N/P são indicadas acima de cada poço. 54
- Figura 22. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação por DNaseI com poliplexos de PC₁₈-CH/pDNA na razão 10 N/P (colunas D à I) e de PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀/pDNA na razão 2 N/P (colunas J à O). A) Ladder, B) pDNA livre, C) pDNA + 2,5u de DNaseI, D) poliplexo PC₁₈-CH/pDNA na razão 10 N/P, E) poliplexo + quitosanase + lisozima, F) poliplexo + 2,5u DNaseI, G) poliplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase + lisozima, H) poliplexo + 5u DNaseI, I) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase + lisozima, J) poliplexo PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀/plasmídeo na razão N/P 3, K) poliplexo + quitosanase + lisozima, L) poliplexo + 2,5u DNaseI, M) poliplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase + lisozima, N) poliplexo + 5u DNaseI, O) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase + lisozima. 55
- Figura 23. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação por DNaseI em poliplexos formados com CH-DEAE₁₅ na razão N/P 2. A) Ladder, B) plasmídeo livre, C) plasmídeo + 2,5u de DNaseI, D) poliplexo, E) digestão do poliplexo com quitosanase, F) poliplexo + 2,5u DNaseI, G) poliplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase, H) poliplexo + 5u DNaseI, I) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase. 56
- Figura 24. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação com DNaseI em poliplexos formados com FA-PEG-CH-DEAE₁₅ na razão N/P 2. A) Ladder, B) plasmídeo livre, C) plasmídeo + 2,5u de DNaseI, D) poliplexo, E) digestão do poliplexo com quitosanase, F) poliplexo + 2,5u DNaseI, G) poliplexo +

2,5u DNaseI + quitosanase, H) poliplexo + 5u DNaseI, I) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase.	56
Figura 25. Diâmetros hidrodinâmicos dos poliplexos de siRNA-SSB formados com quitosana desacetilada (CH ₁₂) e PC ₁₈ -CH em pH 6,3 (a). Potencial zeta para os poliplexos formados com o derivado PC ₁₈ -CH nas razões N/P 20 e 100 (b); e Diâmetros hidrodinâmicos dos poliplexos de siRNA-SSB formados com CH-DEAE ₁₀₀ em pH 7,4 (c).....	58
Figura 26. Diâmetros hidrodinâmicos dos poliplexos de siRNA-SSB formados com os derivados (■) PC ₁₈ -CH em pH 6,3 e (■)CH-DEAE ₁₅ em pH 5,0 em função do tempo em horas, na razão N/P 20.....	59
Figura 27. Diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta dos poliplexos de siRNA-SSB formados com (a) CH-DEAE ₁₅ e (b) DEAE ₁₅ -CH-PEG-FA em pH 6,3.....	60
Figura 28. Eletroforese dos poliplexos preparados com PC ₁₈ -CH e siRNA-SSB em pH 6,3 em função do tempo de corrida em minutos (a) 1, (b) 2, (c) 5, (d) 15 e (e) 30.....	61
Figura 29. Eletroforese dos poliplexos formados com (a) PC ₁₈ -CH, (b) FA-PEG-CH-PC ₁₈ e siRNA-SSB em pH 6,3. Tempo de corrida de 30 minutos. As razões N/P estão indicadas acima de cada poço.	61
Figura 30. Eletroforese dos poliplexos formados com siRNA-SSB e (a) CH-DEAE ₁₅ em pH 5,0 e (b) CH-DEAE ₁₀₀ em pH 7,4 . As razões N/P são indicadas acima de cada poço.	62
Figura 31. Eletroforese dos poliplexos formados com siRNA-SSB e (a) CH-DEAE ₁₅ e (b) siRNA-SSB como controle negativo em pH 6,3. As razões N/P são indicadas acima de cada poço.	62
Figura 32. Eletroforese dos poliplexos formados com FA-PEG-CH-DEAE ₁₅ e (a) siRNA-SSB e (b) siRNA-SSB controle negativo em pH 6,3. As razões N/P estão descritas acima de cada poço.	63
Figura 33. Viabilidade celular de células HeLa em função da concentração dos polímeros da série I e da lipofetamina.	64
Figura 34. Viabilidade celular de células HeLa em função da concentração dos polímeros da série II e da lipofetamina.	65
Figura 35. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros da série I em pH 6,3.	66
Figura 36. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros PC ₂₀ -CH e PC ₂₀ -CH-DEAE ₁₀₀ em pH 7,4.	67

- Figura 37. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros da série II em pH 7,4. 67
- Figura 38. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero PC₁₈-CH em pH 6,3. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005..... 68
- Figura 39. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero CH-DEAE₁₅ em pH 6,3. 69
- Figura 40. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero DEAE15-CH-PEG-FA em pH 6,3. 69
- Figura 41. Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com CH₁₂, PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₂₂ e PC₁₈-CH-DEAE₄₄ em pH 6,3. Valores de expressão de β-gal/proteína total. * p<0,05 e ** p<0,01..... 72
- Figura 42. Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com PC₂₀-CH, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀ em pH 7,4. Valores de expressão de β-gal/proteína total. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005..... 73
- Figura 43. a) Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4. b) Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com CH₁₇ (1), CH-DEAE₁₅ (2), CH-DEAE₂₅ (3), CH-DEAE₈₀ (4) e CH-DEAE₁₀₀ (5) em pH 5,0 e pDNA livre (6) e lipofectamina (7). (Adaptado de (OLIVEIRA, F. D. P. P., 2011; OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013)). Valores de expressão de β-gal/proteína total. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005..... 75
- Figura 44. Eficiência de transfecção in vitro. 5 μg de siRNA-SSB livre e complexos de PC18-CH/siRNA (a), PC18-CH-PEG-FA/siRNA (b) e lipofetamina/siRNA contendo o equivalente a 5 μg de siRNA-SSB incubados com células HeLa. A expressão do gene SSB é medida por meio de RT-PCR em tempo real e comparada às células não tratadas, considerada como 100%. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005. 78
- Figura 45. Eficiência de transfecção in vitro. 5 μg de siRNA-SSB livre e complexos de CH-DEAE₁₅/siRNA (a) e DEAE₁₅-CH-PEG-FA/siRNA (b) e lipofetamina/siRNA contendo o equivalente a 5 μg de siRNA-SSB incubados com células HeLa. A expressão do gene SSB é medida por meio de RT-PCR em tempo real e comparada às células não tratadas, considerada como 100%. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005. 79
- Figura 46. Espectros de RMN de ¹H, 400 MHz, dos polímeros CH, PC₁₈-CH e PC₂₀-CH em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C..... 95

Figura 47. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos polímeros CH, $\text{PC}_{18}\text{-CH}$ e $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{70}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.....	96
Figura 48. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos polímeros $\text{PC}_{20}\text{-CH}$ e $\text{PC}_{20}\text{-CH-DEAE}_{100}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.....	96
Figura 49. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos polímeros $\text{PC}_{18}\text{-CH}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{22}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{44}$ e $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{70}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.....	97
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero CH em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.....	97
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero $\text{PC}_{20}\text{-CH}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.....	98
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero $\text{PC}_{20}\text{-CH-DEAE}_{100}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) à 70 °C.	98
Figura 53. Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada CH.	99
Figura 54. Titulação condutométrica do derivado $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{22}$	99
Figura 55. Titulação condutométrica do derivado $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{38}$	100
Figura 56. Titulação condutométrica do derivado $\text{PC}_{20}\text{-CH-DEAE}_{100}$	100
Figura 57. Titulações potenciométricas dos derivados CH_{12} , $\text{PC}_{18}\text{-CH}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{22}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{44}$ e $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{70}$	101
Figura 58. Titulações potenciométricas dos derivados $\text{PC}_{20}\text{-CH}$ e $\text{PC}_{20}\text{-CH-DEAE}_{100}$	101
Figura 59. Titulações potenciométricas de todos os derivados da série I.	102
Figura 60. Curva de calibração com ajuste polinomial do padrão Pullulan dos cromatogramas de GPC.	102
Figura 61. Cromatogramas da GPC das quitosanas, CH_{12} , CH_{29} , CH e da quitosana de partida para obtenção da CH (CH_{Wako} , GD 85%).	103
Figura 62. Cromatogramas da GPC dos polímeros CH_{12} , $\text{PC}_{18}\text{-CH}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{22}$, $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{38}$ e $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{44}$	103
Figura 63. Cromatogramas da GPC dos polímeros CH_{29} , $\text{PC}_{20}\text{-CH}$ e $\text{PC}_{20}\text{-CH-DEAE}_{100}$	104

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de moléculas ligantes e células alvos que expressam seus receptores de membrana	24
Tabela 2. Razões em massa de DEAE e de quitosana (DEAE/CH) que deram origem aos derivados com substituições por grupo DEAE da série I.....	41
Tabela 3. Propriedades das quitosanas e seus derivados da série I.....	44
Tabela 4. Propriedades da quitosana desacetilada seus derivados da série II substituídos com DEAE.	46
Tabela 5. Valores de diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta para as NPs formadas em pH 7,4 com os derivados da serie II (CH-DEAEx).....	51
Tabela 6. Valores de CI_{50} dos polímeros da série I, da série II e do lipídeo comercial lipofetamina em células HeLa.	65
Tabela 7. Resultados de M_w , M_n e M_w/M_n dos polímeros da série I, em $g \cdot mol^{-1}$	104

Símbolos e Abreviações

μ : Força Iônica

$[\eta]$: viscosidade intrínseca

AR: artrite reumatoide

BCA: ácido bicinconínico

BMDO: 5,6-benzo-2-metil-1,3-dioxepano

cDNA: DNA complementar

CH: quitosana

CH-DEAEx: derivado de quitosana contendo DEAE

CH-PEG-FA: derivado de quitosana contendo o ligante folato

CI₅₀: Concentração na qual ocorre inibição de 50% da viabilidade celular

Cp: Concentração total do polímero

Ct: fluorescência gerada no primeiro ciclo

CT: Capacidade de Tamponamento

DCC: *N,N*-diciclohexilcarbodiimida

DEAE: dietilaminoetila

Dh: Diâmetro hidrodinâmico

DMEM: meio de cultura Dulbecco Mem

DMSO: dimetil sulfóxido anidro

DOPE: dioleoilfosfatidiletanolamina

FBS: Soro Fetal Bovino

FR: receptor de folato

GD: Grau de Desacetilação

GPC: Cromatografia de Permeação em Gel

GSdeae: Grau de substituição de dietilaminoetila

GSdeae_q: Grau de substituição de grupos DEAE com amina quaternária

GSpc: Grau de substituição de fosforilcolina

IL-1: interleucina1

IL-1 Ra: receptor antagonista da interleucina-1

K_a: constante de dissociação ácida

M_n: massa molar numérica média

MR: receptor de manose

MTS: 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) -2 - (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio

M_v: massa viscosimétrica média

M_w: Massa molar ponderal média

M_w/M_n: polidispersividade

N: grupos amina do polication

NH₂-PEG-COOH: polietileno glicol hetrobifuncional

NHS: *N*-hidroxisuccinimida

N/P: Razão entre os grupos amina do polication e grupos fosfato do ácido nucleico

NPs: nanopartículas

P: grupos fosfato do DNA

PAA: poli(amido-amina)

PBS: tampão fosfato salino

PC: Fosforilcolina gliceraldeído

PCx-CH: derivado de quitosana contendo PC

PDMAEMA: Poli (2-dimetilaminoetil metacrilato)

pDNA: DNA plasmidial

PEG-FA: ácido fólico ligado em polietileno glicol

PEI: polietilenimina

pKa: negativo do logaritmo de base 10 da constante de dissociação ácida (K_a); $pK_a = -\log K_a$

PLL: poli-L-lisina

PMS: metassulfato de fenazina

PS: penicilina-estreptomicina

RISC: Complexo de indução de silenciamento do RNA

RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

siRNA: RNA de interferência curto

TBE: tampão de ácido Tris-EDTA-bórico

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

α : grau de ionização

β -gal: β -galactosidase

$\Delta\text{Ct}(\text{GAPDH})$: diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e tratada com siRNA para o cDNA do GAPDH

$\Delta\text{Ct}(\text{SSB})$: diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e a amostra tratada com siRNA para o cDNA do SSB

Capítulo 1

Introdução

1.1. Introdução geral

No começo dos anos 70, a ideia de usar genes como biofármacos surgiu nos Estados Unidos e a primeira terapia gênica aprovada naquele país foi realizada em 1989 (GIACCA, 2010). Após 23 anos, 1800 ensaios clínicos com terapia gênica foram efetuados e importantes avanços alcançados (GINN et al., 2013). Dentre eles, mais de 30 pacientes com síndrome de imunodeficiência combinada grave por deficiência de adenosina desaminada foram tratados com terapia gênica, sendo considerada eficaz e segura (FERRUA; BRIGIDA; AIUTI, 2010). No entanto, mais de 81,5% dos ensaios clínicos foram feitos para o tratamento de diferentes neoplasias e ainda não se encontrou uma solução definitiva para o tratamento dessas doenças (GINN et al., 2013).

A artrite é uma doença inflamatória crônica que atinge 21% dos adultos nos Estados Unidos, 16% no Canadá e 13% no Reino Unido (HELMICK et al., 2008; O'DONNELL et al., 2011; WONG, 2010). No Brasil, a prevalência de artrite reumatóide, um dos tipos de artrite, é de 0,2 até 1% da população brasileira (~1,3 milhões), dependendo da macroregião (DA MOTA et al., 2011). No entanto, apenas 0,7% de todos os ensaios clínicos com terapia gênica foram realizados para tratamento de doenças inflamatórias. O vetor mais comum utilizado para ensaios de tratamento de artrite é o vírus adeno-associado (AVV) modificado com DNA complementar (cDNA), contendo o gene que codifica a proteína antagonista do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), importante no processo de inflamação (MEASE et al., 2009). Os estudos mostraram-se seguros e sem grandes efeitos adversos. No entanto, um paciente faleceu ao ser tratado para artrite reumatoide com injeções intra-articulares de AVV, que ocasionou infecção fúngica (WILLIAMS, 2007).

Devido aos problemas de segurança, os vetores não virais estão sendo cada vez mais estudados, visando-se aumentar a segurança e a eficiência da transfecção gênica, que é definida pela capacidade de expressão do gene na célula alvo, tendo por finalidade de restabelecer sua função. Poucos estudos clínicos com vetores não virais foram feitos com humanos até hoje, pois ainda existem muitas barreiras que dificultam esse processo, como instabilidade do vetor, degradação do DNA ou RNA por enzimas, baixa especificidade quanto às células alvo e baixa eficiência de transfecção gênica (KIM, T.-H. et al., 2007). A maioria dos estudos tem sido realizada *in vitro* e ainda é preciso muito trabalho para o avanço da terapia gênica com esses carreadores. Um dos exemplos mais estudados de vetores não virais são os polímeros catiônicos que interagem facilmente com DNA ou RNA, devido as suas cargas negativas permanentes.

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver polímeros catiônicos com alta eficiência de transfecção gênica e baixa citotoxicidade. Para isso, o polímero natural quitosana foi escolhido por ser o segundo polissacarídeo mais abundante, ser atóxico, de fácil manipulação e de baixo custo. Entretanto, a eficiência de transfecção gênica da quitosana é ainda muito baixa. O polímero é insolúvel em pH fisiológico e também não apresenta seletividade quanto às células alvo. A presente proposta teve como foco as modificações na massa molecular, na adição de grupos químicos para aumentar a solubilidade em meio fisiológico e a eficiência de transfecção (fosforilcolina e dietilaminoetila) e na especificidade por células contendo receptores para ácido fólico. Um trabalho amplo foi realizado com o objetivo de avaliar o impacto das modificações na estrutura da quitosana na eficiência de transfecção. O trabalho foi conduzido em etapas e envolveu as caracterizações dos polímeros modificados, a formação de poliplexos com plasmídeos e RNA, o estudo da viabilidade celular e a eficiência de transfecção *in vitro*. Para a caracterização dos polímeros, foram utilizadas as técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Os poliplexos formados com plasmídeo ou RNA de interferência curto (siRNA) foram analisados via eletroforese e espalhamento de luz dinâmico. Os testes *in vitro* de transfecção e citotoxicidade foram feitos com células HeLa e analisados por meio de testes ELISA para β -galactosidase (β -gal) e MTS/PMS, respectivamente. Os ensaios de transfecção com siRNA foram analisados por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Além disso, um estudo *in vivo* com camundongos suscetíveis à indução de artrite foi iniciado, sendo tratados com siRNA-TNF- α .

e um dos polímeros selecionados após o estudo *in vitro*. Este estudo ainda está em fase de análise.

As quitosanas modificadas foram preparadas no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia do Prof. Dr. Marcio José Tiera no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-IBILCE-UNESP e as análises da formação de políplexos e os estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Laboratório de Ortopedia do Prof. Dr. Julio C. Fernandes do Centro de Pesquisa do Hospital do Sacré-Coeur de Montreal, afiliada à Universidade de Montreal no Canadá.

1.2. Terapia gênica

A terapia gênica é a estratégia clínica com uso de manipulação genética, introdução de genes e uso da tecnologia do DNA recombinante, para o tratamento de doenças (KRESINA, 2001). Um dos tratamentos é realizado pela inserção de um gene normal que irá ser transcrito e traduzido à proteína de interesse, processo conhecido como transfecção gênica. O plasmídeo é um vetor de clonagem comum para a obtenção de grande quantidade do gene de interesse, podendo produzir a proteína que estava em deficiência (BROWN, 2010). No caso de proteínas produzidas erroneamente, o siRNA pode ser utilizado para bloquear o RNA mensageiro (mRNA) dessas proteínas, impedindo sua tradução (FERNANDES et al., 2012; UNDERWOOD, 2010). Existem três modalidades principais de terapia gênica, modificação direta do gene que causa uma doença hereditária monogênica, tratamento indireto de doenças complexas, multifatoriais ou adquiridas por modulação gênica e imunoterapia de doenças infecciosas ou células patogênicas por modulação gênica (vacina de DNA) (LINDEN, 2010).

Um dos pontos mais importantes para a segurança e eficácia dessa terapia é a seleção do vetor, que faz a proteção e o transporte do material genético à célula alvo. Sem esse vetor o gene é facilmente degradado por endonucleases. Vetores virais ou não virais são usados como carregadores de genes na terapia gênica. Mais de 75% dos ensaios clínicos utilizaram vetores virais e somente em torno de 25% com vetores não virais, sendo que 18% foram feitos com DNA livre e 6% com lipídeos catiônicos (GINN et al., 2013).

1.2.1. Vetores virais

Os vírus são seres acelulares compostos de um material genético em um envoltório proteico e, em alguns casos, protegido por uma capa adicional de proteína e lipídeos. Somente infectando uma célula hospedeira com o seu material genético é que este pode se multiplicar. Sendo assim, a principal função dos vírus é exatamente a inserção de seu material genético em células hospedeiras e, conseqüentemente, a replicação desse material. Por esse motivo, estes são os vetores mais utilizados em ensaios clínicos. Para que estes sejam usados como vetores para terapia gênica, seu material genético é manipulado e modificado com a inserção do gene terapêutico de interesse e da remoção dos genes patogênicos (HEILBRONN; WEGER, 2010; LINDEN, 2010).

Existem duas categorias de vetores virais que integram ou não o seu genoma à cromatina da célula hospedeira. Os retrovírus e os vírus adeno-associados são capazes de fazer essa integração, passando a mudança no genoma para as células filhas, aumentando a expressão gênica em longo prazo. Por isso, esses vírus são usados com maior frequência para a terapia (KOOTSTRA; VERMA, 2003). No entanto, reações adversas graves podem ocorrer com a utilização desses vetores. Em 1999, um paciente morreu por falência múltipla de órgãos ao ser tratado com o vetor adenovírus, realizado *in vivo* diretamente no fígado. Alguns anos depois, dois pacientes desenvolveram leucemia ao serem tratados com retrovírus, nesse caso o tratamento foi *ex-vivo* (THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003). Além das reações adversas, essa alternativa terapêutica é de alto custo. Contudo, muitos esforços estão sendo feitos para aumentar a segurança e eficiência desses vetores.

1.2.2. Vetores não virais

Pensando em uma maneira mais segura de se transferir um gene de interesse a células alvo, vetores não virais vêm sendo estudados há mais de vinte anos. Além disso, esses são de fácil produção e de baixo custo, quando comparados aos virais. Dentre esses estão os plasmídeos “livres” (*naked* pDNA) e complexos de pDNA ou siRNA com os lipídeos e os polímeros catiônicos.

1.2.2.1. Plasmídeos

Plasmídeos (pDNA) são DNA de dupla fita circular, encontrados em bactérias e alguns outros organismos, que podem carregar um ou mais genes. É por meio deles que as bactérias desenvolvem resistência a antibióticos. Eles são capazes de se multiplicar independentemente do cromossomo da bactéria, pois contém sua própria origem de replicação (Figura 1). Seu tamanho pode variar de 1 a 250 kb, porém se usa um tamanho de até 10 kb para a clonagem de um gene de interesse, por esse ser de mais fácil manipulação (BROWN, 2010).

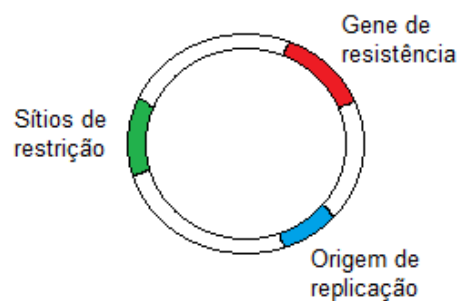


Figura 1. Plasmídeo com os genes de resistência a antibióticos, origem de replicação e os sítios de restrição, onde o gene de interesse pode ser inserido.

Na terapia gênica, pDNA livres podem ser utilizados por injeções diretas nas células alvo. Em determinadas condições, DNA exógeno pode entrar na célula e, parte dele, acaba se localizando no núcleo, propiciando sua expressão. No entanto, a eficiência de transfecção é muito baixa. Várias técnicas físicas já foram desenvolvidas para aumentar a taxa de transferência de pDNA para dentro de células. Eletroporação (HELLER; UGEN; HELLER, 2005), bombardeamento de partículas (O'BRIEN; LUMMIS, 2002) e ultrassom (NEWMAN; BETTINGER, 2007) são exemplos de técnicas que facilitam a entrada do pDNA na célula. Para aumentar a proteção do pDNA contra degradações e a eficiência de transfecção, compostos químicos podem ser usados envolvendo lipídeos e polímeros catiônicos.

1.2.2.2. Lipídeos catiônicos

Moléculas anfífilicas de baixa polaridade são compostas por uma “cabeça” hidrofílica e uma “cauda” hidrofóbica (Figura 2a). Exemplos dessas moléculas são os fosfolipídeos presentes nas bicamadas lipídicas de membranas celulares (VAN HOLDE; JOHNSON; HO, 2006). No caso de lipídeos catiônicos utilizados como vetores, a parte hidrofílica é carregada

positivamente, o que facilita a interação com as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA. Por serem anfifílicas, essas moléculas formam micelas ou lipossomos em meio aquoso havendo interação eletrostática entre as cargas positivas do lipídeo e as negativas do DNA, formando os lipoplexos (Figura 2b) (MA et al., 2007). A entrada do DNA na célula é facilitada pela interação dos lipídeos catiônicos e a bicamada lipídica da membrana. Esse processo de transfecção gênica usando lipídeos é chamado de lipofecção (FELGNER et al., 1987). Alguns lipídeos já estão disponíveis comercialmente como, por exemplo, a lipofectamina 2000TM e o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (BING WANG, 2012; FELGNER et al., 1987).

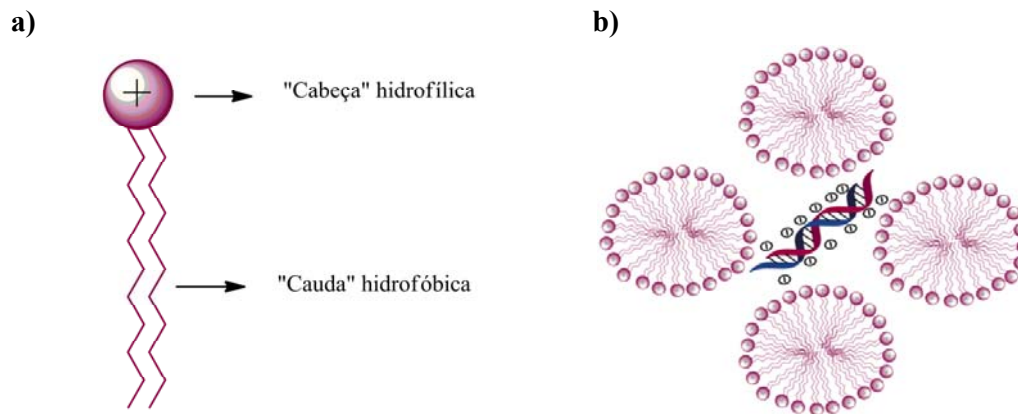


Figura 2. Lipídeo catiônico (a) e lipoplexo (b).

A eficácia de transfecção desses vetores é bastante significativa. No entanto, a toxicidade é o maior obstáculo para o seu uso clínico (BING WANG, 2012). Em geral, os grupos hidrofílicos contêm grupos amina e conferem cargas positivas ao lipídeo. Esse caráter catiônico dos grupos polares é o que mais influencia na toxicidade. Por exemplo, as aminas quaternárias são mais tóxicas que as terciárias (BING WANG, 2012; LV et al., 2006). Por esse motivo, estudos com modificações nos grupos polares de lipídeos estão sendo realizados para diminuir a toxicidade e aumentar a eficiência de transfecção com DNA ou no silenciamento de mRNA por siRNA (CHEVRE et al., 2011; DESIGAUX et al., 2007; FLOCH et al., 2000; GUENIN et al., 2000; VAN DER WOUDE et al., 1997).

Floch et. al. desenvolveram uma série de fosfolipídeos catiônicos com o grupo polar contendo os átomos de fósforo e arsênio, melhorando a transfecção e diminuindo a toxicidade celular (FLOCH et al., 2000). Muitos estudos ainda deverão ser realizados tendo como foco modificações em lipídeos catiônicos para que seu comportamento biológico seja controlado e,

enfim, sejam utilizados com segurança e alta eficiência para a terapia gênica (BING WANG, 2012).

1.2.2.3. Polímeros catiônicos

Outro grupo de vetores não virais muito estudado nos últimos anos são os polímeros catiônicos ou polications. O que diferencia esses carreadores dos lipídeos catiônicos é a ausência do grupo hidrofóbico e a facilidade de formar complexos com o DNA. A estrutura que contém unidades carregadas positivamente faz com que esses polímeros interajam facilmente com os grupos fosfato do DNA carregados negativamente, formando os poliplexos (ELOUAHABI; RUYSSCHAERT, 2005) (Figura 3).

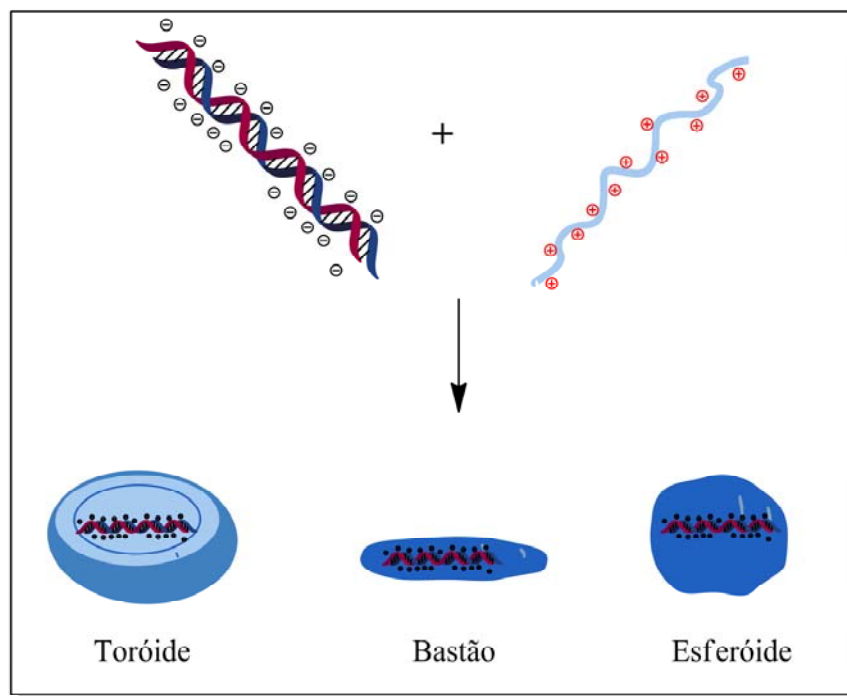


Figura 3. Interação entre os polieletrólitos, DNA e polications, na formação de poliplexos.

A utilização de polímeros catiônicos como carreadores de genes foi inicialmente realizada por Wu, em 1987, demonstrando que polications, naquele caso a poli-L-lisina, podem interagir fortemente com DNA, mas de forma não covalente (WU, G. Y.; WU, 1987). Além disso, polímeros são de fácil produção e manipulação, havendo a possibilidade de variar massa molecular e sua estrutura química para que se possa controlar a toxicidade, a

eficiência de transfecção e até mesmo a especificidade celular (MINTZER; SIMANEK, 2008).

O processo de transfecção celular utilizando polímeros ainda não foi totalmente elucidado. A hipótese mais aceita para explicar a liberação do DNA na célula é conhecida como “esponja de prótons”. Essa hipótese propõe que os poliplexos entram na célula por meio de endocitose e, com o decréscimo do pH no meio endossomal, o grau de ionização dos poliplexos aumenta, facilitando a entrada de íons. Isso aumenta a força iônica fazendo com que haja um entumescimento do endossomo, auxiliando na liberação do poliplexo e do DNA no citoplasma (Figura 4). Admitindo essa hipótese, polímeros com alta capacidade de tamponamento podem facilitar na liberação de poliplexos do endossomo (BEHR, 1997; JIANG et al., 2007).

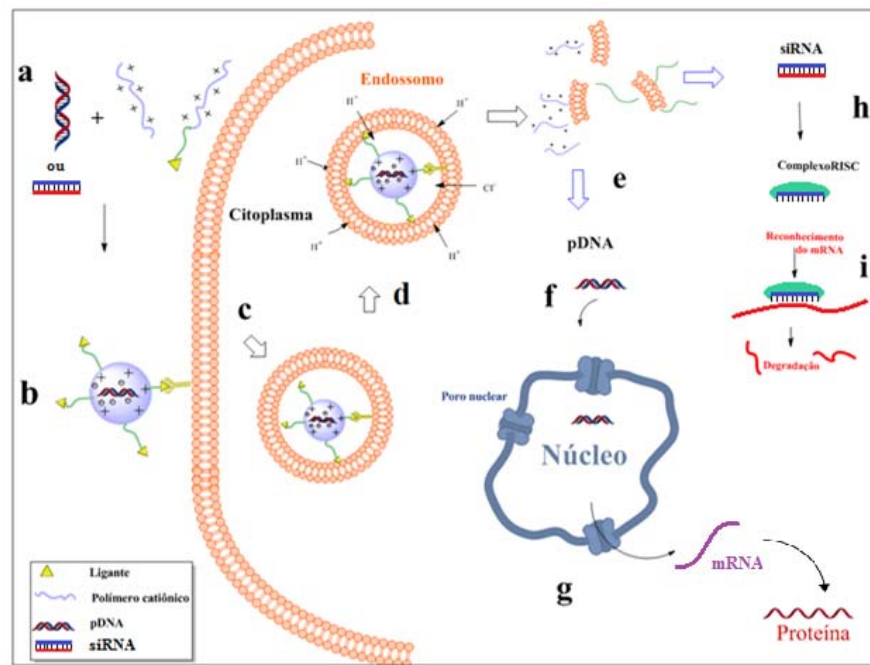


Figura 4. Representação hipotética de “esponja de prótons”. a) Interação eletrostática e formação de poliplexos. b) Reconhecimento do ligante pelos receptores celulares da membrana. c) Entrada do poliplexo por meio de endocitose. d) Hipótese de esponja de prótons e liberação dos polieletrólitos no meio citoplasmático. f) Entrada do pDNA livre no núcleo. g) Síntese da proteína. h) Liberação do siRNA e interação com o complexo de indução de silenciamento do RNA (RISC). i) Reconhecimento do mRNA e sua degradação.

Muitos fatores, como a composição polimérica, o pH e força iônica do meio, podem influenciar na interação de polímeros com DNA ou siRNA, bem como na toxicidade e na

eficiência de transfecção gênica. Um elevado número de trabalhos já foi realizado para avaliar diferentes composições poliméricas e adição de grupos químicos com o intuito de aumentar a eficiência de transfecção e diminuir a toxicidade de polímeros. Dentre os polímeros catiônicos estudados como possíveis vetores para transfecção gênica destacam-se a poli-L-lisina (PLL), a polietilenimina (PEI), poli(amido-amina) (PAA), metacrilato de poli-2-dimetilaminoetila, β -ciclodextrina e quitosana.

A) Poli-L-lisina (PLL)

O monômero que faz parte da composição da poli-L-lisina é o isômero L do aminoácido lisina (Figura 5). Esse aminoácido contém, na cadeia lateral, um segundo grupo amina primário carregado positivamente em pH 7,0 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Na década de 70, descobriu-se que esse polycation era capaz de condensar o DNA em duas diferentes estruturas em forma de toróides e bastões (LAEMMLI, 1975; OLINS; OLINS, 1971). Depois disso, em 1987, Wu e colaboradores usaram o conceito de interação eletrostática forte e não covalente da PLL com o DNA para usá-los como sistema carreador de gene solúvel. Nesse trabalho, conjugou-se “asialoorosomucoide” à PLL como mediador para seletividade dos poliplexos por células contendo o receptor asialoglicoproteína e, pela primeira vez, demonstrou-se que um polycation poderia ser modificado para proporcionar seletividade celular (WU, G. Y.; WU, 1987).

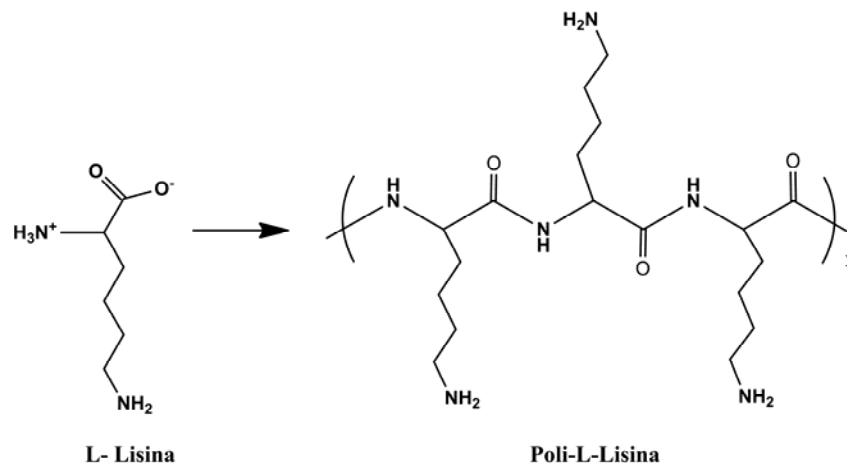


Figura 5. Estrutura do aminoácido L-lisina e da poli-L-lisina.

Muitos parâmetros podem influenciar na interação entre polycations e DNA, como o pH, força iônica (μ) e a massa molecular (Mw) do polímero. Read e seus colaboradores demonstraram que, dependendo do pH do meio, PLL com alta Mw (459 kDa) é mais efetiva

na ligação com o DNA. No entanto, PLL de baixa Mw (3,4 kDa) também pode complexar o DNA utilizando maiores razões N/P (N= grupos amina do polycation, P = grupos fosfato do DNA), havendo portanto um excesso de grupos amina livres. O estudo mostrou que o aumento do pH de 7,0 para 9,0 diminui a força de interação entre os polieletrólitos, devido a desprotonação dos grupos amina (READ et al., 1999). Liu, em 2001, verificou que a interação entre esses polieletrólitos pode ser cooperativa ou não, dependendo da força iônica (μ) do meio. Enquanto uma elevada μ induz ligação não cooperativa, para baixas μ a ligação é cooperativa (LIU, G. et al., 2001). Além disso, o tamanho dos poliplexos pode variar. Em meio com μ baixa, o tamanho variou de 50 a 60 nm. Entretanto, para a força iônica do meio fisiológico, 150 mM de NaCl, os tamanhos dos poliplexos formados com PLL de baixa Mw não são estáveis em função do tempo, devido à agregação hidrofóbica, podendo chegar a 1 μ m de diâmetro (WARD; READ; SEYMOUR, 2001).

A citotoxicidade de polímeros catiônicos é um fator a ser considerado e no caso da PLL, sua citotoxicidade é elevada. Alta expressão gênica e baixa toxicidade foram obtidas, por Ohsaki e colaboradores, com dendrímeros de PLL, com redução na interação com os componentes do soro sanguíneo, trazendo a expectativa de aumentar o tempo de vida dos poliplexos na corrente sanguínea e a possibilidade de síntese de materiais avançados, para o controle da transfecção gênica *in vivo* (OHSAKI et al., 2002). Putnam e colaboradores modificaram a PLL com grupos imidazol e obtiveram um polímero menos tóxico e com eficiência de transfecção duas vezes superior que a PLL não modificada, e concluiu-se que um balanço entre a densidade de cargas positivas e grupos funcionais que auxiliem o escape endossomal pode ser um caminho para a síntese de polycations efetivos e com baixa citotoxicidade (PUTNAM et al., 2001).

B) Polietilenimina (PEI)

A PEI, assim como a PLL, também contém grupos aminas passíveis de protonação e mantém sua capacidade de tamponamento em uma grande faixa de pH (JEONG et al., 2001). Além disso, é a macromolécula orgânica com maior densidade de cargas positivas, podendo ser linear, contendo predominantemente aminas secundárias, ou ramificada, com aminas primárias, secundárias e terciárias (Figura 6) (LUNGWITZ et al., 2005). Mostrou-se que esse polycation é altamente eficiente na transfecção gênica, na mesma ordem das lipopoliaminas (BOUSSIF et al., 1995). Klemm, Young e Lloyd verificaram que PEI entra em células por meio de endocitose, competindo na ligação de uma proteína por receptores de membrana,

sendo capaz de desestabilizar lisossomos, explicando o processo de liberação de políplexos no citoplasma (KLEMM; YOUNG; LLOYD, 1998). No entanto, assim como a PLL, sua citotoxicidade é alta, devido à alta densidade de cargas positivas (FISCHER et al., 2003).

Existem grandes diferenças nas propriedades de políplexos formados por PEI linear e ramificado, que vai desde a formação dos complexos até a citotoxicidade. PEI ramificado mostra-se muito mais tóxico que o linear (ZOU et al., 2000). Fischer e colaboradores sintetizaram PEI com baixo grau de ramificação e com baixa Mw (11,9 kDa) e verificaram melhora na eficiência e baixa citotoxicidade quando comparado com PEI comercial de alta Mw (800 kDa) (FISCHER et al., 1999). Em outro trabalho, comparou-se a eficiência de transfecção de PEI linear e ramificado em função da concentração de sal no preparo dos políplexos. Nesse caso, mostrou-se que PEI linear foi mais efetivo que o PEI ramificado, em meio contendo ou não sal. Verificou-se ainda que a presença de sal ocasiona agregação de políplexos formados com PEI linear e que essa agregação, de certa forma, aumenta a sua eficiência (WIGHTMAN et al., 2001).

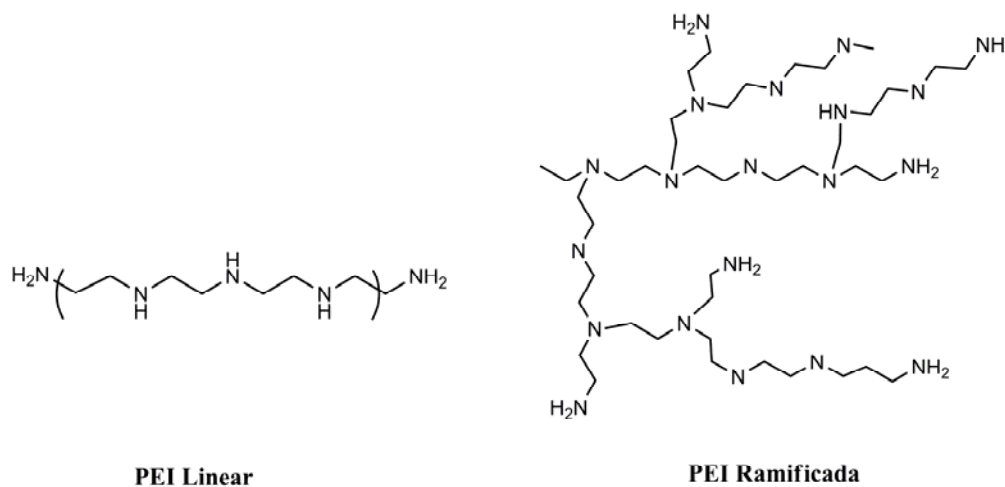


Figura 6. Estrutura da polietilenimina linear e ramificada.

Além de modificações na Mw e na ramificação de PEI, outras variações foram estudadas com o intuito de melhorar sua eficiência e diminuir sua citotoxicidade. Por exemplo, PEI ramificado (750 kDa) foi modificado com diferentes proporções do polissacarídeo ácido alginico. O produto final resultou em um polímero menos tóxico que o PEI não modificado (PATNAIK et al., 2006). Mais recentemente, Wang e colaboradores sintetizaram PEI de baixa Mw interligado com etileno-*bis*-carbamato. Esse derivado apresentou menor citotoxicidade e alta eficiência de transfecção em diferentes linhagens

celulares em comparação com o PEI não modificado e o vetor comercial lipofectamina 2000, devido a sua interação mais fraca com o DNA, facilitando sua liberação no citoplasma (WANG, Y. Q. et al., 2012).

C) Metacrilato de poli-2-dimetilaminoetila (PDMAEMA)

Esse é um polícatión sintético que contém aminas terciárias em sua composição (Figura 7), sendo sensível ao pH fisiológico, pois seu pK_a é em torno de 7,3. Para valores de pH maiores que seu pK_a o polímero se torna hidrofóbico, e devido à protonação, se torna hidrofílico em pHs abaixo de seu pK_a (LIU, X. et al., 2007). Políplexos preparados com esse polímero podem ter tamanhos entre 0,1 e 1 μm , dependendo da Mw. Esse parâmetro também se mostra muito importante na eficiência de transfecção e na citotoxicidade. Elevadas Mw de PDMAEMA formam políplexos com diâmetros menores e com maior taxa de expressão gênica. No entanto, sua citotoxicidade é maior, devido à desestabilização da membrana celular (LAYMAN et al., 2009; VAN DE WETERING et al., 1997).

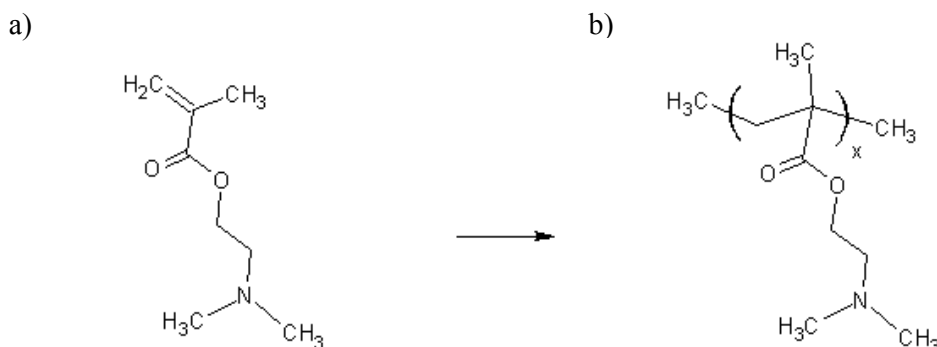


Figura 7. Estrutura do metacrilato de dimetilaminoetila (a) e do polímero PDEAEMA (b).

Assim como a maioria dos polímeros catiônicos estudados, o PDMAEMA também foi alvo de várias alterações em sua estrutura química, visando-se aumentar a eficiência de transfecção, diminuir sua citotoxicidade e facilitar sua biodegradação. You e colaboradores desenvolveram PDMAEMA com um grupo dissulfeto e um anel benzênico entre seus monômeros. Com essa síntese, obteve-se um produto com expressão gênica três a quatro vezes maiores e citotoxicidade reduzida (YOU et al., 2007). Em 2012, Zhang e colaboradores modificaram PDMAEMA com diferentes proporções do grupo 5,6-benzo-2-metil-1,3-dioxepano (BMDO) com o objetivo de sintetizar um polímero biodegradável. Com isso, verificou-se que a ligação éster no BMDO pode ser degradada por hidrólise básica ou em

condições enzimáticas. Os poliplexos formados com os derivados tiveram diâmetros menores que 250 nm e a citotoxicidade dos polímeros diminuiu com o aumento da quantidade de BMDO no PDMAEMA. Além disso, a eficiência de transfecção também melhorou em comparação ao polímero não modificado. No entanto, essas duas modificações feitas no PDMAEMA não foram suficientes para melhorar a eficiência de transfecção quando comparado ao polímero PEI (ZHANG, Y. et al., 2012).

1.3. Quitosana

As biomoléculas mais abundantes na natureza são os carboidratos. A oxidação dessas moléculas é o caminho central para a obtenção de energia em células que não realizam fotossíntese. A maioria dos carboidratos é encontrada na forma de polissacarídeos, contendo 20 ou mais unidades de monossacarídeos (“sacarídeo” é derivado da palavra grega *sakcharon* e significa açúcar). O glicogênio, subunidades de monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas ($\alpha_{1\rightarrow4}$), é o polissacarídeo mais utilizado como reserva energética pelas células animais. Enzimas encontradas na saliva e nas secreções intestinais fazem a hidrólise desse polímero quebrando as ligações ($\alpha_{1\rightarrow4}$) (LEHNINGER et al., 2005).

O polissacarídeo encontrado na natureza em maior quantidade é a celulose. Assim como o glicogênio, também é formado por unidades de glicose, porém suas ligações glicosídicas são de configuração β ($\beta_{1\rightarrow4}$). Com essa configuração, a celulose não pode ser hidrolisada pelas enzimas dos animais, havendo a formação de ligações hidrogênio entre os grupos hidroxilas das unidades repetitivas, trazendo rigidez e insolubilidade em água (LEHNINGER et al., 2005).

Depois da celulose, a quitina é o polissacarídeo mais abundante, fazendo parte principal da composição dos exoesqueletos de crustáceos, insetos e fungos. A diferença entre a celulose e a quitina é a presença do grupo acetamida no lugar do grupo hidroxila do carbono C-2 do monômero de glicose, unidade conhecida como *N*-acetil- β -D-glucosamina. Sendo assim, sua composição corresponde à ($\beta_{1\rightarrow4}$)-2-acetamino-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 8) (LEHNINGER et al., 2005).

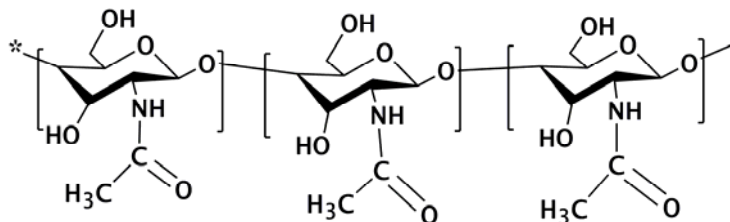


Figura 8. Estrutura da quitina.

As fontes de biomassa de quitina são conjugadas com minerais, proteínas, lipídeos e pigmentos. As carapaças de crustáceos podem conter entre 30-40% de proteínas, 30-50% de carbonato de cálcio e 20-30% de quitina (ARANAZ et al., 2009). A purificação desse polissacarídeo pode ser feita por meio de processos simples de desmineralização e de desproteínização, por exemplo, das carapaças de crustáceos, que é inutilizada na indústria alimentícia. O primeiro é realizado com a utilização de ácidos, preferivelmente do HCl, e o segundo em meio básico, com altas concentrações de NaOH. Percot et. al. aperfeiçoou o processo de desmineralização de casca de camarão com o uso de 0,25 M de HCl em temperatura ambiente por 15 min e a desproteínização foi realizada em 1 M de NaOH a 70 °C, obtendo quitina com menos de 0,01% de cálcio e 0,25% de aminoácidos (PERCOT; VITON; DOMARD, 2003a;2003b). As concentrações de ácido ou base e a temperatura nesses processos podem influenciar no grau de acetilação e na massa molecular final da quitina. A desacetilação da quitina é um dos processos de obtenção de quitosana, polissacarídeo catiônico encontrado em grande quantidade nas cascas de krill antártico, *Euphausia superba* (ROBERTS, 2008).

Partindo da quitina, quando a quantidade de $(\beta_{1\rightarrow4})$ -2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose é menor que a de $(\beta_{1\rightarrow4})$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, obtém-se o polissacarídeo quitosana (Figura 9). Essa composição, com aminas livres, faz da quitosana um polímero catiônico e solúvel em meio aquoso ácido, devido à protonação. Esse polímero pode ser produzido a partir da desacetilação da quitina, um processo simples podendo ser feito por diferentes procedimentos (BATISTA; ROBERTS, 1990; KIM, Y. J. et al., 2008). A hidrólise básica dos grupos amida é a forma mais comum utilizada para obtenção de quitosana com altos graus de desacetilação. Nesse caso, a reação é feita em 47% em massa de NaOH, temperatura de 110 °C e em atmosfera inerte de nitrogênio (MIMA et al., 1983; ZHANG, H. et al., 2004).

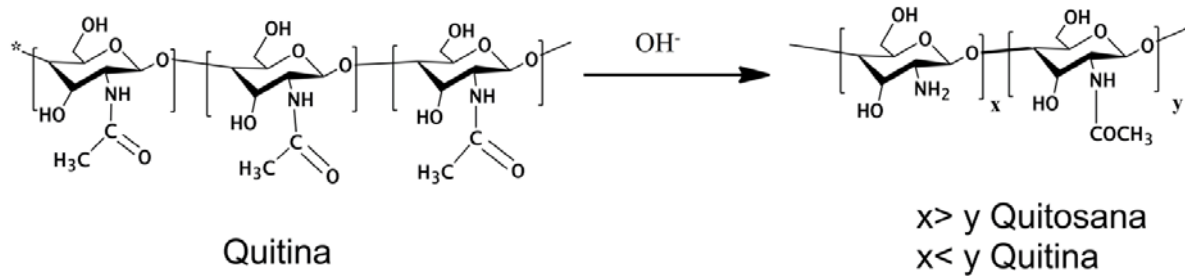


Figura 9. Reação de desacetilação da quitina para obtenção de quitosana.

A solubilidade da quitosana é fortemente dependente do grau de ionização (α) dos seus grupos aminas (RINAUDO; PAVLOV; DESBRIÈRES, 1999). O pK_a dos monômeros de glucosamina pode variar de 6,2 à 7,0. Para polieletrólitos, a constante de dissociação ácida (K_a) pode ser obtida por meio da curva de titulação potenciométrica e pode ser descrita pela equação de Katchalsky (KATCHALSKY; SHAVIT; EISENBERG, 1954; RINAUDO et al., 1999):

$$pH = pKa - \log \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) \quad \text{equação 1}$$

$$\alpha = \left(\frac{[CH-NH_3^+]}{c_p} \right) \quad \text{equação 2}$$

onde C_p é a concentração total do polímero.

Em 1983, em um dos primeiros trabalhos em que se analisou o equilíbrio ácido-base da quitosana, observou-se um valor de pK_a em torno de 6,1, para $\alpha < 0,72$, 6,7, para $\alpha > 0,72$ e 6,4 na presença de sal, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl (CHOI, 1983). Rinaudo e colaboradores verificaram que a quitosana, de massa molecular viscosimétrica média (M_v) de 295 kDa, se torna solúvel em meio aquoso quando o seu α é maior que 0,5 e que o seu pK_0 , no qual o polieletrólito se encontra sem cargas, é 6,0, independente da característica do ácido, se fraco, por exemplo ácido acético (HAc), ou forte, como o ácido clorídrico (HCl) (RINAUDO et al., 1999). Isso faz da quitosana um polissacarídeo insolúvel em pHs fisiológicos. Mesmo assim, a facilidade desse biopolímero em interagir eletrostaticamente com o DNA, por ser um polímero catiônico, aumentou o interesse nesse polímero como carreador para a terapia gênica. Verifica-se que essa interação forma partículas de tamanhos entre 40 e 500 nm e

formatos variados como esferas, toróides e bastões, dependendo da massa molar da quitosana (KOPING-HOGGARD et al., 2004; MACLAUGHLIN et al., 1998).

Em geral, a estrutura da quitosana é definida pela fração molar das unidades desacetiladas, conhecida como grau de desacetilação (GD), massa molar ponderal média (Mw) e a polidispersividade (Mw/Mn). Esses importantes parâmetros químicos podem afetar as propriedades biológicas desse polímero, como biodegradabilidade (TOMIHATA; IKADA, 1997), biocompatibilidade (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001), atividades antitumoral (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001), antibacteriana (GERASIMENKO et al., 2004) e antioxidante (ARANAZ et al., 2009).

1.3.1. Grau de Desacetilação (GD)

A determinação do GD da quitosana com alta precisão é fundamental para caracterização e definição de suas propriedades. Muitas técnicas já foram descritas para a obtenção desse parâmetro. Espectroscopias de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) (KASAAI, 2010; LAVERTU et al., 2003), Espectrofotometria UV-Vis (WU, T.; ZIVANOVIC, 2008; YUAN et al., 2011), Infravermelho (KASAAI, 2008), titulações potenciométricas (TOLAIMATE et al., 2000; YUAN et al., 2011) e condutimétricas (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993) são alguns exemplos dos métodos. RMN de ^1H é a técnica mais precisa e muito utilizada para essa finalidade. Depois da RMN, a titulação potenciométrica é a mais aceita, tendo boa precisão e baixo custo, precisando cuidado no preparo das soluções a serem utilizadas (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012).

Polissacarídeos são geralmente degradados por hidrólise enzimática, como, por exemplo, com a enzima lisozima. A biodegradabilidade da quitosana pode estar fortemente ligada ao GD (BAGHERI-KHOULENJANI; TAGHIZADEH; MIRZADEH, 2009). Tomihata e colaboradores prepararam filmes de quitosanas com diferentes GD e verificaram que a biodegradabilidade é mais lenta e a reação inflamatória é menor quanto maior o GD (TOMIHATA; IKADA, 1997). Além disso, quanto maior o GD, maior a citotoxicidade *in vitro* do polímero (HUANG; KHOR; LIM, 2004). A eficiência de transfecção gênica, a interação com o DNA e sua liberação também podem ser afetados pelo GD, como verificado por Kiang et al. (KIANG et al., 2004).

A massa molecular desse polissacarídeo pode ser determinada a partir de medidas viscosimétricas, por meio da equação de Mark-Houwink (equação 3).

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{equação 3}$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, M_v é a massa molecular viscosimétrica média, K e a são parâmetros viscosimétricos dependentes do solvente, do polímero e da temperatura (KASAAI, 2007). Essa técnica pode ser muito influenciada pelo GD do polímero, fazendo com que os coeficientes a e K variem consideravelmente. Quanto maior o GD, menor o valor de a e maior o de K , concluindo que a presença dos grupos acetila influencia na rigidez da cadeia polimérica (ANTHONSEN; VÅRUM; SMIDSRØD, 1993; BADAWY; RABEA, 2011; WANG, W. et al., 1991).

A literatura mostra um grande número de estudos com quitosanas de massas moleculares variadas, que visam aperfeiçoar o transporte e liberação de genes (MACLAUGHLIN et al., 1998; MORÁN et al., 2009; SATO; ISHII; OKAHATA, 2001; VILA et al., 2004). Quitosanas de elevada massa molecular (390 kDa) e diferentes GD foram utilizadas e concluiu-se que a interação e formação de poliplexos com DNA é enfraquecida com o decréscimo do GD. Notou-se ainda que a expressão gênica *in vitro* aumenta quanto maior o GD, mas *in vivo* o oposto é obtido. Quitosanas com menor GD são mais facilmente degradadas por enzimas *in vivo*, o que pode explicar o aumento na expressão gênica. Nesse mesmo trabalho, o tamanho e o potencial zeta dos poliplexos não tiveram dependência com esse parâmetro (KIANG et al., 2004).

1.3.2. Massa Molecular

A biosíntese de polissacarídeos é realizada a partir da polimerização de monossacarídeos e não contém uma sequência limite e específica, como no caso das proteínas. Por esse motivo, essas biomoléculas são polidispersas (BADAWY; RABEA, 2011; LEHNINGER et al., 2005). Após os processos de purificação e desacetilação da quitina para a obtenção de quitosana, a massa molecular média do polímero final pode variar entre 100 a 1500 kDa, dependendo do material fonte e das técnicas de purificação e desacetilação (BADAWY; RABEA, 2011; GALED et al., 2005; PUVVADA; VANKAYALAPATI;

SUKHAVASI, 2012). Ademais, também se pode despolimerizar quitosanas, para obtenção de polímeros de menor massa molecular ou oligômeros, a partir do processo de degradação química utilizando nitrito de sódio (MACLAUGHLIN et al., 1998; PENISTON, 1975; TOMMERAAS et al., 2001) ou por degradação enzimática pela hidrólise das ligações glicosídicas ($\beta_{1\rightarrow4}$), mesmo processo utilizado na degradação da celulose (XIE, 2011). Para a análise da Mw final desse polissacarídeo as técnicas mais frequentes são cromatografia de permeação em gel (GPC) e viscosidade (BADAWY; RABEA, 2011; DE CARVALHO CANELLA; GARCIA, 2001; XIE, 2011).

A massa molecular é outro parâmetro que influencia muito nas propriedades biológicas da quitosana. A atividade antibacteriana da quitosana aumenta com a concentração de grupos amina, devido à interação de suas cargas positivas com as negativas da membrana celular de bactérias. No entanto, dependendo da faixa de tamanho a atividade também é afetada com a variação de Mw. Entre 5 e 91,5 kDa, a atividade antibacteriana aumentou, e entre 91,5 e 1080 kDa, a atividade diminuiu (FEI LIU et al., 2001). Outro trabalho utilizou um modelo para a produção de vacina com quitosana. Nesse caso, os níveis de anticorpos observados não variaram significativamente com a variação da massa molecular da quitosana. No entanto, verificou-se que a resposta imunológica foi mais rápida para partículas formadas com quitosanas de menor Mw, especulando-se que a massa molecular pode influenciar na taxa de liberação do antígeno ou nas propriedades imunoestimulatórias da quitosana (VILA et al., 2004).

Esse parâmetro pode ainda alterar a força de interação com o DNA, a solubilidade e o tamanho dos poliplexos (LAVERTU et al., 2006; RICHARDSON; KOLBE; DUNCAN, 1999), mas ela não afeta significativamente a citotoxicidade (HUANG et al., 2004). Lavertu e colaboradores analisaram o efeito da massa molecular e do GD na afinidade de interação com o DNA e na eficiência de transfecção gênica, explorando quitosanas de 10 a 180 kDa e 70 a 98% de GD. Todas as quitosanas formaram complexos com DNA cujos tamanhos variaram de 200 a 400 nm de diâmetro, com exceção do oligômero de 10 kDa que formou poliplexos de 600 a 1000 nm. O aumento no tamanho das partículas foi atribuído à baixa afinidade de ligação com o DNA com a diminuição da Mw. No entanto, o potencial zeta dos complexos não se mostrou dependente da Mw, mas diminuiu consideravelmente com o aumento do pH do meio de 6,5 para 7,1. Como descrito anteriormente, o pKa da quitosana é ~6,5 e com o aumento do pH o seu grau de ionização diminui, reduzindo o potencial zeta dos complexos. Na análise da eficiência de transfecção, constatou-se que as quitosanas de massas

moleculares menores foram mais eficientes e as condições ótimas são atingidas com uma combinação de massa molecular baixa (10-40 kDa) e grau de desacetilação elevado (92%) da quitosana (LAVERTU et al., 2006).

1.3.3. Quitosanas Modificadas

Além da massa molecular e do grau de desacetilação, existem outras formas de modificar as propriedades da quitosana. Esse polímero é multinucleofílico devido à presença dos grupos funcionais hidroxilas e amins da glucosamina. As reações de modificação podem ser quimiosseletivas, ocorrendo no grupo amina da posição C-2, e não específicas, ocorrendo simultaneamente nos grupos hidroxilas das posições C-3 e C-6 (BADAWY; RABEA, 2011). Assim, várias reações orgânicas podem ser executadas com esses grupos funcionais, tais como sulfonação (JAYAKUMAR et al., 2007), quaternização (THANOU et al., 2002; VERHEUL et al., 2008), reação de Michael (SASHIWA et al., 2003) e base de Schiff (JIAO et al., 2011). Modificações hidrofóbicas e hidrofílicas, grupos sensíveis ao pH e capazes de selecionar células alvo por meio de receptores celulares, podem ser adicionados à cadeia polimérica da quitosana, com o objetivo de melhorar suas propriedades como vetor não viral para a terapia gênica.

1.3.3.1. Modificações hidrofílicas

Como indicado anteriormente, a quitosana é insolúvel em pHs fisiológicos. Por esse motivo, encontram-se muitos trabalhos na literatura que objetivaram aumentar sua solubilidade, aumentando a eficiência de transfecção, sem afetar na citotoxicidade. Kean e colaboradores modificaram a quitosana com diferentes graus de trimetilação dos grupos amina. A metilação foi feita por substituição nucleofílica, utilizando iodeto de metila. Essa estratégia aumenta a solubilidade da quitosana em água, não perturbando a sua habilidade de complexar o DNA. Verificou-se que a citotoxicidade aumentou com o aumento do grau de trimetilação, mas todos os derivados mostraram-se menos tóxicos que o polímero PEI. Ainda se notou que oligômeros de quitosana modificada são menos tóxicos que os polímeros, ambos contendo o mesmo grau de trimetilação. Além disso, a eficiência de transfecção, obtida pelos derivados, foi significativa e o grau de trimetilação ótimo foi de,

aproximadamente, 50%, atingindo uma eficiência maior ou igual ao PEI, dependendo da cultura celular (KEAN; ROTH; THANOU, 2005). Em outro trabalho, as hidroxilas na posição C-6 foram substituídas por grupos amina, obtendo-se um produto final com grupos amina na posição C-2 e C-6 e solúvel em condições neutras e fisiológicas. O estudo comparativo com a quitosana de partida mostrou que a modificação não aumentou a citotoxicidade, e ainda se pôde obter maior expressão gênica. No entanto, ainda é preciso aumentar sua eficiência de transfecção para que possa ser usado em terapia gênica (SATOH et al., 2006).

Outra estratégia para aumentar a solubilidade da quitosana em pHs fisiológicos é a adição do grupo zwiteriônico fosforilcolina (PC) à cadeia polimérica da quitosana, por meio da aminação reductiva dos grupos aminas (Figura 10). A reação ocorre via formação de base de Schiff entre a função aldeído da fosforilcolina gliceraldeído e o grupo amina da quitosana, seguido de redução com cianoboroidreto de sódio. Os derivados com graus de substituição de fosforilcolina maiores que 10% são solúveis em meios aquosos, independente do pH. Além disso, os polímeros mostraram-se não tóxicos em células humanas KB para todos os graus de substituição (GS) (TIERA et al., 2006). Em outro trabalho, Meng e colaboradores também prepararam quitosanas modificadas com PC. Verificou-se que esses derivados são mais hemocompatíveis e diminuem a adsorção de proteínas, o que pode reduzir a ativação do sistema imunológico, melhorando o desempenho de materiais biomédicos (MENG et al., 2007).

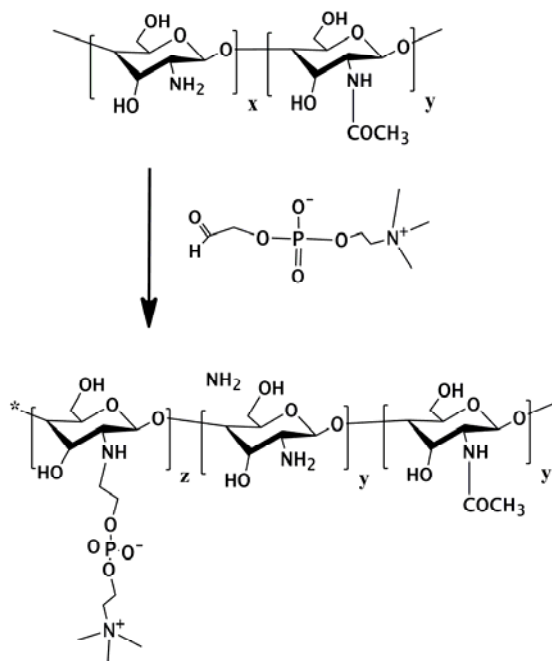


Figura 10. Modificação de quitosana com fosforilcolina (PC).

1.3.3.2. Grupos sensíveis ao pH

Grupos sensíveis ao pH podem melhorar a capacidade de tamponamento da quitosana e aumentar a eficiência da transfecção. O que faz do polycation PEI altamente eficiente na transfecção gênica é a sua capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH, facilitando o escape endossomal por meio do processo hipotético de “esponja de prótons”. Essa propriedade se deve à presença de grupos amina primária, secundária e terciária (BOUSSIF et al., 1995; NEU; FISCHER; KISSEL, 2005). Sendo assim, a inserção de grupos que modifiquem a quitosana com aminas secundárias e terciárias pode auxiliar no escape endossomal de poliplexos, aumentando a expressão gênica. PEI (JIANG et al., 2007), imidazol (GHOSN et al., 2010) e espermina (JIANG et al., 2011), são alguns exemplos de grupos sensíveis ao pH.

Estudos recentes mostram que copolímeros de quitosana e PEI são uma alternativa interessante para melhorar a eficiência de transfecção com controle da citotoxicidade. Derivados desse tipo foram preparados por meio de uma reação imina entre a quitosana oxidada, por periodato de potássio, e os grupos amina do PEI. O produto final resultou em

um copolímero solúvel em água devido às propriedades hidrofílicas do PEI e hábil na formação de complexos com DNA. Como descrito anteriormente, PEI é um polímero com grande número de grupos amina em sua estrutura e possui alta capacidade de tamponamento. Essa propriedade faz com que o derivado contendo PEI facilite o escape endossomal e aumente a eficiência de transfecção em três linhagens celulares diferentes, além de apresentar baixa citotoxicidade quando comparado ao PEI (JIANG et al., 2007).

Ghosn e colaboradores modificaram a quitosana com grupos imidazol com diferentes graus de substituição. Esse grupo contém duas aminas secundárias e, conseqüentemente, aumenta a solubilidade e a capacidade de tamponamento da cadeia polimérica da quitosana nos pHs fisiológico e endossomal, com citotoxicidade mínima. As nanopartículas (NPs) preparadas com siRNA exibiram tamanhos variando de 150 a 300 nm e foram administradas *in vivo* por vias sistêmica e local mostrando-se eficientes no silenciamento de genes. No entanto, não houve melhora significativa na transfecção administrada intranasal quando comparada à quitosana não modificada, pois a alta viscosidade desse derivado pode ter afetado a aproximação das NPs aos pulmões (GHOSN et al., 2010).

Também com o intuito de aumentar a capacidade de tamponamento, Jiang e colaboradores modificaram a quitosana com o grupo espermina. Esse grupo contém quatro aminas, duas primárias e duas secundárias, e está naturalmente presente em células eucarióticas. Nesse trabalho, mostrou-se que a viabilidade celular não foi afetada pela adição de espermina na quitosana em três linhagens diferentes de células. Verificou-se ainda um grande aumento na eficiência de transfecção, *in vitro* e *in vivo*, quando comparada à quitosana não modificada, em virtude da alta capacidade de tamponamento e conseqüente escape endossomal pelo efeito de esponja de prótons (JIANG et al., 2011).

Seguindo esse raciocínio, a modificação de quitosanas com diferentes graus de substituição de dietilaminoetila (DEAE), que contém uma amina terciária, foi proposta no presente trabalho. Ao substituí-lo na quitosana, introduz-se aminas secundárias, terciárias e quaternárias à cadeia polimérica, aumentando a solubilidade e a capacidade de tamponamento (Figura 11). O procedimento para essa modificação foi descrito por Zambito et. al. utilizando solução de quitosana em meio ácido e cloreto de 2- cloro-*N,N*-dietilaminoetila (ZAMBITO et al., 2006) e empregado no presente trabalho.

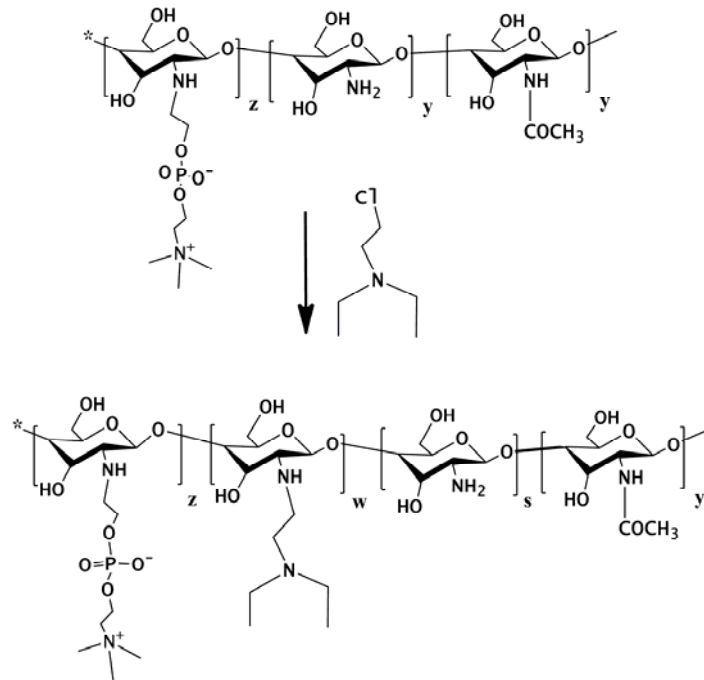


Figura 11. Síntese de derivados de quitosana contendo DEAE.

1.3.3.3. Grupos seletivos

Um dos maiores desafios da terapia gênica é a seleção das células pelos vetores, para assim dar sequência à liberação e inserção dos genes. Por esse motivo, muitos ensaios são realizados *ex-vivo*, onde a terapia é realizada, primeiramente, em células retiradas do paciente e, após o tratamento, as células são reinsertadas (NALDINI, 2011). A estratégia para a seleção de células alvo com vetores não virais é a sua modificação com a inserção de ligantes que são reconhecidos por receptores de membrana das células-alvo. Exemplos de ligantes são o ácido fólico, manose, lactose e galactose (Tabela 1).

Hepatócitos são células hepáticas que contêm grande quantidade do receptor de membrana asialoglicoproteína, que se ligam às moléculas de galactose e as internalizam por meio de endossomos. Kim e colaboradores modificaram a quitosana com o grupo galactose com o intuito de formar poliplexos capazes de selecionar células contendo seu receptor. Os graus de substituição obtidos nos derivados variaram de 6,9 a 9,3%, todos eles não foram citotóxicos e exibiram grande habilidade na formação de poliplexos com DNA. Testes *in vitro* demonstraram que os poliplexos preparados com a quitosana modificada apresentaram

maior afinidade por hepatócitos, o que aumentou significativamente a eficiência de transfecção, comparado à quitosana não modificada (KIM, T. H. et al., 2004).

Tabela 1. Exemplos de moléculas ligantes e células alvos que expressam seus receptores de membrana

Ligante	Receptor de membrana	Célula alvo
Ácido Fólico	FR- α	Células tumorais humanas (LOW; KULARATNE, 2009)
	FR- β	Macrófagos sinoviais (FERNANDES et al., 2008; NAKASHIMA-MATSUSHITA et al., 1999)
Manose	MR (EAST; ISACKE, 2002)	Células dendríticas (ENGERING et al., 1997)
Lactose	Receptor asialoglicoproteína (WU, G. Y.; WU, 1988)	Células hepáticas (HORIUCHI; AOYAMA, 2006) e condrócitos (DONATI et al., 2005)
Galactose	Receptor asialoglicoproteína (KIM, T. H. et al., 2004)	Células hepáticas (KIM, T. H. et al., 2004; ZANTA et al., 1997)

A artrite reumatoide (AR), uma doença inflamatória que resulta na destruição das cartilagens e danos nos ossos, pode ser tratada via terapia gênica. Células mononucleares sinoviais, retiradas de pacientes com AR, e macrófagos articulares, isolados de ratos com artrite induzida por adjuvante, expressam o receptor de folato em grande quantidade. Sendo assim, quitosana modificada com ácido fólico foi preparada e analisada *in vivo*, em ratos com artrite induzida por adjuvante. Os poliplexos foram formados com o cDNA do receptor antagonista da interleucina-1 (IL-1 Ra) que interfere na ação da interleucina1 (IL-1), proteína importante no processo de inflamação sinovial. Verificou-se que o conteúdo de folato não

interferiu na complexação e integridade do DNA. Além disso, observou-se que os poliplexos formados com o derivado inibiram significativamente os níveis de IL-1 β , comparado com os níveis dos ratos não tratados, indicando que a presença de folato mediou o processo de endocitose (FERNANDES et al., 2008).

1.4. Estratégias para obtenção de quitosana como um vetor não viral eficiente

Muitos trabalhos foram realizados para avaliar a eficiência de transfecção utilizando a quitosana como vetor não viral. Verificou-se que sua eficiência está relacionada a vários fatores, como massa molar (SATO et al., 2001; STRAND et al., 2010), pH do meio (LAVERTU et al., 2006; SATO et al., 2001), força de interação entre os polieletrólitos (STRAND et al., 2010), excesso de policação (THIBAUT et al., 2011), razão N/P (LAVERTU et al., 2006), potencial zeta das partículas (HUANG et al., 2005; KOPING-HOGGARD et al., 2001) e do tipo de célula utilizada in vitro (CORSI et al., 2003).

A massa molar influencia a força de interação entre o policação e o DNA, alto grau de polimerização aumenta a interação reduzindo a expressão gênica (STRAND et al., 2010). O excesso de policação promove a liberação dos poliplexos das vesículas endo-lisossomais, necessário para que o poliplexo chegue ao citoplasma e ao núcleo (THIBAUT et al., 2011). A eficiência de transfecção da quitosana é maior em meios ácidos, devido ao seu maior grau de ionização, podendo ser utilizado para transfectar células tumorais, já que o pH extracelular dessas fica em torno de 6-7 (SATO et al., 2001). Além disso, o processo de transfecção realizado pela quitosana não se dá pela hipótese de esponja de prótons, diferentemente do polímero PEI, pois ela não contém alta capacidade de tamponamento na faixa de pH endossomal. Sendo assim, Hoggard e colaboradores chegaram à conclusão de que a liberação do DNA e a eficiência de transfecção estão relacionadas à degradação por enzimas, como a lisozima, formando oligo e monossacarídeos que aumentam a osmolaridade endossomal e, conseqüentemente, faz o entumescimento e ruptura da membrana vesicular (KOPING-HOGGARD et al., 2001). Por esse motivo, o processo de transfecção é mais lento quando comparado a PEI. Contudo, quitosana com alto grau de desacetilação tem sua biodegradabilidade reduzida podendo impedir ou retardar o escape endossomal, diminuindo ou atrasando a expressão gênica (LAVERTU et al., 2006).

Entre as propriedades que fazem da quitosana um potencial carreador para a terapia gênica pode-se mencionar a sua capacidade de complexar o DNA (LIU, W. et al., 2005) e siRNA (KATAS; ALPAR, 2006), a biocompatibilidade (VANDEVORD et al., 2002), biodegradabilidade (BAGHERI-KHOULENJANI et al., 2009), baixa resposta imunogênica e baixa toxicidade (RICHARDSON et al., 1999). No entanto, a sua solubilidade em pHs fisiológicos e a sua baixa eficiência de transfecção são ainda um desafio nessa área. Nos últimos anos, muitas modificações têm sido feitas na quitosana para melhorar a sua eficiência, como na massa molecular (RICHARDSON et al., 1999), no grau de desacetilação (KIANG et al., 2004), na quaternização (VERHEUL et al., 2008), substituição de grupos sensíveis ao pH (JIANG et al., 2007; JIANG et al., 2011) e ligantes capazes de selecionar células alvo (FERNANDES et al., 2008). A partir da revisão bibliográfica realizada até agora, pode-se resumir as estratégias para o aprimoramento da quitosana como vetor não viral com o seguinte diagrama:

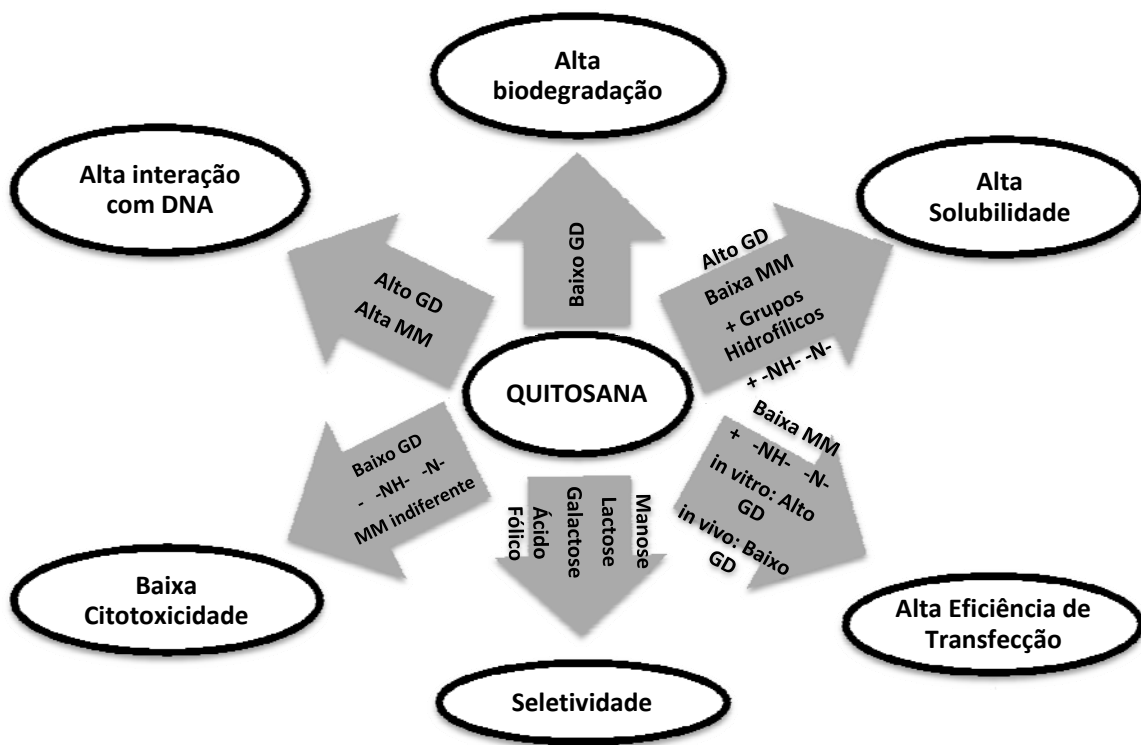


Figura 12. Diagrama com as estratégias para obtenção de quitosanas efetivas como vetores não virais para terapia gênica.

No presente estudo, propõem-se modificações na quitosana para melhorar sua eficiência de transfecção gênica. Essas modificações incluem quitosanas de baixa massa molecular, elevado GD, a adição de grupos fosforilcolina (PC), dietilaminetila (DEAE) e ácido fólico. O GD elevado aumenta a estabilidade de poliplexos e a eficiência de transfecção. Quitosana substituída com fosforilcolina tem melhor solubilidade em água e reduz a adsorção de proteínas (MENG et al., 2007; TIERA et al., 2006). Um dos principais passos do mecanismo de entrega de genes na transfecção é a liberação dos poliplexos do endossomo para o citoplasma (VARKOUHI et al., 2011). Uma vez que a esponja de prótons é o principal mecanismo que explica a fuga de poliplexos do meio endossomal, o aumento da capacidade de tamponamento da quitosana é uma estratégia útil para melhorar o mecanismo de esponja de prótons (BEHR, 1997; SONAWANE; SZOKA; VERKMAN, 2003). Outra estratégia utilizada, para aumentar a capacidade de tamponamento e o grau de ionização em pH fisiológico da quitosana, foi a modificação dos grupos amina primária da quitosana com grupos amina secundária e terciária utilizando o grupo DEAE.

1.5. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo de quitosanas modificadas estruturalmente para produção de vetores não virais eficientes para a terapia gênica. As modificações visam aumentar a capacidade de tamponamento, o grau de ionização, a solubilidade em pHs fisiológicos, a seletividade por células contendo receptor de membrana para folato e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de transfecção gênica de vetores não virais.

Objetivos específicos:

1. Síntese e caracterização de derivados de quitosana inserindo grupos PC, DEAE e ácido fólico à cadeia polimérica.
2. Estudo físico-químico da associação dos derivados de quitosana com DNA (pDNA) e RNA de interferência (siRNA) focalizando a formação e propriedades das nanopartículas, como tamanho, estabilidade e proteção dos ácidos nucleicos.
3. Estudo da citotoxicidade dos polímeros e dos poliplexos.

4. Investigação da eficiência de transfecção gênica dos poliplexos preparados com os derivados e o plasmídeo VR1412 ou siRNA-SSB.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os derivados foram sintetizados a partir de quitosana de 50 kDa e 80% de GD, (Polymar). Água deionizada foi adquirida a partir de sistema Milli-Q de purificação de água (Millipore). Glicero-3-fosforilcolina foi comprado da Bachem, Torrance, CA, USA. Cloridrato de 2-dietilaminoetila, polietileno glicol heterobifuncional (NH₂-PEG-COOH) 3500 Da e ácido fólico foram adquiridos da Aldrich Chemical Co. Soro fetal bovino (FBS), mistura de penicilina-estreptomicina (PS), 0,25% tripsina-EDTA, meio de cultura Dulbecco Mem (DMEM), brometo de etídeo, agarose, reagente TRIzol, lipofectamina 2000, DNA ladder 1 kb foram obtidos de Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON). Todos os solventes e reagentes foram utilizados tal como recebidos. Spectra / Pore membranas (Spectrum) foram utilizados para as diálises dos polímeros.

O DNA de plasmídeo VR1412, que codifica o gene β -galactosidase (β -gal) com um promotor de citomegalovírus (CMV) e um tamanho de 8100 kb, foi fornecido por Vical Inc. (San Diego, CA, EUA). Utilizou-se o mega kit da Qiagen para a extração e purificação do plasmídeo. Para a verificação da viabilidade celular e da eficiência de transfecção gênica, fez-se o uso dos ensaios CellTiter96[®] aquoso não radioativos de proliferação celular (Promega Corporation) e do kit ELISA para β -gal, respectivamente.

O siRNA utilizado, foi fornecido por Merck & Co Inc (West point, PA), tendo como alvo o RNA mensageiro (RNAm) do antígeno da síndrome Sjogren (SSB, número de acesso ao base de dados NCBI: NM 009278). A análise de RNA das células, transfectadas ou não, foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) por dois passos. Primeiramente, utilizou-se o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Logo após, aplicou-se o kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) para a quantificação de cDNA em tempo real.

2.2. Instrumentação

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados num espectrômetro de Bruker ARX-400 de 400 MHz a 70 °C. Os espectros UV-Visível foram medidos com um espectrofotômetro de UV-visível / Shimadzu (Man-Tech Associates, Inc.), um leitor de microplacas Universal-EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) para ensaio Elisa e para as medições de viabilidade celular. Zetasizer Nano-série Nano-ZS90, laser de 633 nm e ângulo de espalhamento de 90° (Malvern), foi utilizado para medidas de tamanho e potencial zeta dos políplexos. Análises de cromatografia de permeação em gel foram realizadas em HPLC Shimadzu LC-20A com detector de índice de refração Shimadzu RID-10A, do laboratório de fotoquímica da prof^a. Dr^a. Carla Cristina Schmitt Cavaleiro do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos da USP. Para experimentos de eletroforese utilizou-se cuba eletroforética horizontal com fonte de energia GIBCO-BRL (Life Technologies).

2.3. Métodos

2.3.1. Desacetilação e degradação da quitosana (MIMA et al., 1983)

Conforme relatado anteriormente (CASE et al., 2009), a desacetilação da quitosana foi realizada dissolvendo-se 8,0 g de quitosana em 200 mL de ácido acético 2%. Essa solução foi adicionada a 100 mL de solução aquosa de NaOH, a 50% em massa sob agitação constante. A reação foi realizada a 100 °C sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética durante 1 hora e 30 minutos. Após esse tempo, o produto foi vertido em 4 L de água deionizada pré-aquecida a 80 °C, sob agitação. O precipitado foi decantado, lavado cinco vezes com água deionizada e separado por filtração. O procedimento foi repetido uma vez para se obter maior grau de desacetilação.

O produto bruto (5 g) foi dissolvido em solução de ácido acético 2% (300 mL) para o processo de degradação. Gás nitrogênio foi borbulhado na solução durante 1 hora para

remover o oxigênio dissolvido na solução e a mesma foi resfriada até 4 °C. Uma solução de NaNO₂ (20 mL, 0,18 mol.L⁻¹) foi adicionada gota a gota à mistura e a reação foi mantida a 4 °C por 24 horas. O polímero foi purificado por diálise (Mw 2000, Spectra/poro) contra água deionizada durante 48 horas, um dia contra NaOH 0,05 mol.L⁻¹ e 2 dias em água (a água foi trocada três vezes por dia) e a quitosana isolada por liofilização.

2.3.2. Preparo de quitosanas substituídas com fosforilcolina (PC)

Fosforilcolina gliceraldeído (PC) foi preparado a partir da oxidação da *s,n*-glicero-3-fosfocolina com periodato de sódio (LIBERDA et al., 1999). Para o preparo de derivado de quitosana com, aproximadamente, 18% de graus de substituição, utilizou-se uma solução de PC em metanol (1.66 mmol/10 mL) foi adicionada gota a gota a uma solução aquosa de 1,3 g de quitosana em ácido acético 2% (52 mL) sob agitação a 0 °C, em banho de gelo, durante 30 min. O pH da mistura foi ajustado para 6,5, e a solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida, a solução foi novamente resfriada a 0 °C e adicionou-se, gota a gota sob agitação, uma solução de cianoborohidreto de sódio (8 mmol em 10 mL de água desionizada), e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente, por 20 horas. O polímero final foi purificado por diálise contra água por 48 horas, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ por 24 horas e mais uma vez contra água durante mais 48 horas. A água foi trocada três vezes por dia e o polímero purificado foi isolado por liofilização (TIERA et al., 2006).

2.3.3. Preparo de quitosanas substituídas com dietilaminoetila (DEAE)

Para a adição de DEAE em quitosanas contendo PC, DEAE sólido foi adicionado a uma solução de PC-quitosana em 15 ml de HCl 0,1 mol.L⁻¹. O pH foi ajustado a 8,0 adicionando NaOH 2 mol.L⁻¹. A mistura foi aquecida sob agitação a 65 °C em banho de água e, a cada 30 minutos, o pH foi ajustado. Finalmente, o produto bruto foi purificado por diálise contra NaOH 0,05 mol.L⁻¹ por um dia, e contra água durante 3 dias e liofilizado. Os polímeros modificados somente com DEAE, sem substituições de PC, foram preparados por Franciele de Paula Pansani Oliveira em seu trabalho de mestrado (OLIVEIRA, F. D. P. P., 2011; ZAMBITO et al., 2006).

2.3.4. Síntese das quitosanas contendo o ligante ácido fólico (CHUL CHO et al., 2005).

Primeiramente, éster de folato-NHS é preparado a partir da ativação de ácido fólico com N-hidroxisuccinimida (NHS). Para isso, 300 mg de ácido fólico foi dissolvido em 12 mL de dimetil sulfóxido anidro (DMSO) juntamente com 93 mg de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 77 mg de *N*-hidroxisuccinimida (NHS). A reação foi realizada à temperatura ambiente por 6 horas, sob agitação. Após a reação o precipitado branco formado foi removido por filtração. A solução filtrada foi adicionada em 100 mL de acetona 30% em éter dietílico formando um precipitado amarelo, o folato-NHS. Esse foi coletado por filtração e lavado com acetona e etanol. Posteriormente, preparou-se FA-PEG-COOH pela adição de éster de folato-NHS em solução de 450 mg de NH₂-PEG-COOH em 100 mL de piridina em temperatura ambiente, sob agitação e na ausência de luz. O produto final, FA-PEG-COOH, foi seco por rotaevaporação, dissolvido em 20 mL de água deionizada, purificado por meio de diálise (1000 Da de exclusão) contra tampão fosfato 10 mM pH 7,4 por um dia e contra água deionizada por 48 horas e, finalmente, liofilizado.

Para o preparo de quitosana contendo o ligante folato (CH-PEG-FA), ativou-se 40 mg de FA-PEG-COOH em 5 ml de DMSO com 2,5 mg de hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC) e 5,8 mg de NHS, mantido em temperatura ambiente por quatro horas, sob agitação. 200 mg de quitosana desacetilada foi dissolvida em 20 ml de ácido acético 2% e o FA-PEG-COOH ativado foi adicionado à solução de quitosana. A reação foi realizada no escuro por 20 horas. O produto final foi purificado por diálise (5000 Da ou 10-15 kDa de exclusão, quitosana degradada ou não, respectivamente) em água deionizada por 3 dias. CH-PEG-FA foi isolado por liofilização. A análise da incorporação de PEG-FA na quitosana foi realizada por meio de medidas de absorvância do ácido fólico com espectrofotômetro UV-visível, utilizando quitosana não modificada como padrão. O coeficiente de extinção do ácido fólico é 6165 M⁻¹ cm⁻¹, em 363 nm.

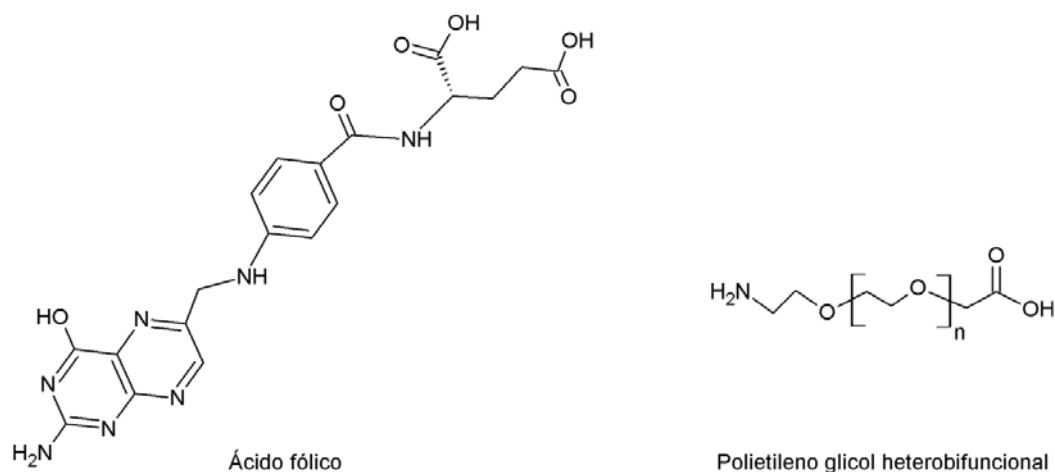


Figura 13. Estrutura do ácido fólico e do polietileno glicol heterobifuncional.

2.3.5. Caracterização dos polímeros

2.3.5.1. Determinação do grau de substituição por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os polímeros foram caracterizados por RMN de ¹H e titulação potenciométrica para determinação dos graus de desacetilação e de substituição, PC e DEAE. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos a 70 °C e os graus de desacetilação (GD) e de substituição de PC (GSpC) foram calculados utilizando-se as áreas dos sinais referentes ao CH₃ (I_{CH3}) da unidade acetilada e os hidrogênios anoméricos H₁ (I_{H1}) e H_{1s}(I_{H1s}), utilizando-se como referências os trabalhos de Tiera et al. 2006 e Taloimate et al. 2000 (TIERA et al., 2006; TOLAIMATE et al., 2000).

Os graus de substituição por DEAE (GS_{deae}) foram calculados a partir do espectros de RMN de ¹H utilizando as áreas dos sinais dos hidrogênios do CH₃ dos grupos amina terciária e quaternária do grupo DEAE e dos hidrogênios anoméricos, como descrito por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013). Os resultados e a interpretação dos espectros de RMN estão apresentados no capítulo 4.

2.3.5.2. Determinação da massa molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Medidas de cromatografia de permeação em gel foram utilizadas para a determinação da massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e da polidispersividade (M_w/M_n) dos polímeros. A fase móvel utilizada foi o 0,3 M $\text{CH}_3\text{COOH}/0,2$ M CH_3COONa . Duas colunas em série (SB-803 HQ e SB-805- SHODEX), com tamanhos de 8 mm x 300 mm e vazão de 0,8 mL/min, foram utilizadas para separação e análise das amostras e o padrão utilizado para calibração foi o Pullulan de massas molares de 805.000 a 6.200 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

2.3.5.3. Determinação da capacidade de tamponamento.

As capacidades de tamponamento dos derivados foram verificadas por meio de titulações potenciométricas, seguindo procedimentos já descritos na literatura (RICHARD et al., 2013; ZHONG et al., 2005). Os derivados foram previamente secos em estufa em pressão reduzida à 40 °C por 2 horas e preparou-se 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução de NaCl 0,15 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Adicionou-se 0,15 mL de HCl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, para promover completa solubilização dos polímeros. Logo após, adicionou-se NaOH 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para o ajuste do pH até 11, aproximadamente. A titulação foi realizada com alíquotas de HCl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e a capacidade de tamponamento (CT) foi calculada a partir da derivada da curva de número de moles de HCl adicionado (n_{HCl}) em função do pH dividido pelo número de moles de amina em solução (n_{amina}) (Equação 4).

$$CT = \frac{dn_{\text{HCl}}}{dpH} \times \frac{1}{n_{\text{amina}}} \quad \text{equação 4}$$

2.3.6. Amplificação e purificação do DNA de plasmídeo VR1412

O plasmídeo VR1412 foi amplificado em *Escherichia coli* e purificado utilizando o kit Qiagen mega de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Plasmid purification Handbook, terceira edição, 2005). O plasmídeo final foi dissolvido em água e analisado por

eletroforese em gel de agarose a 0,8% e espectrofotômetro UV-Visível em comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

2.3.7. Formação de Poliplexos

Prepararam-se soluções estoque de quitosana em tampão fosfato pH 6,3 e concentração de grupos amina de 9,3 mM, filtradas em ambiente esterilizado com filtro esterilizado com membrana de polietersulfona com poros de 0,45 μm . Para a formação de poliplexos, adicionou-se lentamente, sob agitação, alíquotas da solução estoque de quitosana ao pDNA ou siRNA diluído no tampão desejado. Para cada experimento realizado, utilizou-se uma concentração de grupos fosfato fixa e variou-se a concentração de grupos amina, obtendo-se diferentes razões N/P (N = grupos amina do polication, P = grupos fosfato do DNA). Para as medidas de tamanho e potencial zeta a concentração de grupos fosfatos foi de 0,02 mM, e para os demais experimentos foi de 0,038 mM com pDNA e 0,076 mM com siRNA. Os tampões utilizados foram acetato 50 mM pH 5,0 e força iônica 150 mM, tampão fosfato 25 mM pH 6,3 e força iônica 50 mM e tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e força iônica 150 mM.

2.3.8. O tamanho das partículas e potencial zeta

Na preparação dos poliplexos com quitosana e seus derivados a concentração de DNA ou siRNA foi mantida em 0,02 mM de grupos fosfato, para todas as medições de tamanho e potencial zeta, em razões N/P entre 1 e 20. Os tampões utilizados foram o fosfato 25 mM, pH 6,3, 50 mM de força iônica e de fosfato 50 mM, pH 7,4, 150 mM de força iônica. As soluções das nanopartículas (NPs) foram preparadas em duplicata e as medidas para cada solução, foram realizadas em triplicata.

2.3.9. Eletroforese em gel de agarose e verificação da integridade do plasmídeo

A eletroforese foi realizada utilizando gel de agarose a 0,8% em tampão de ácido Tris-EDTA-bórico (TBE) com corrida de 30 minutos à 80 V em cuba de tamanho 8,5 cm x 6 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x altura) ou 40 min à 170 V em cuba de tamanho 14,5 cm x 13,5 cm x 0,7 cm. A concentração do plasmídeo utilizada para a preparação de políplexos foi de 0,6 µg/poço. A integridade do DNA, após a preparação das partículas, foi verificada por digestão dos polímeros nos políplexos por quitosanase e lisozima, seguida de eletroforese. A digestão foi realizada com a adição de 20 µL de quitosanase 5u/mL e 5 µL de lisozima 1000 u/ml em 25 µL dos diferentes políplexos em razões 2 ou 10 N/P, contendo 0,625 µg de DNA. A mistura foi incubada a 37 °C durante 4 horas e analisada por eletroforese. Também, verificou-se a proteção do DNA contra degradação por DNaseI recombinante de pâncreas bovino (Roche diagnostics, USA). Para isso, preparou-se 40 µL de políplexos, contendo 2 µg de DNA. Adicionou-se DNaseI, 2,5 a 5u, às soluções de políplexos e incubou-se por 20 minutos à temperatura de 37 °C. Inativou-se o DNaseI ao aquecer as amostras a 60 °C por 15 minutos, com adição de 25 mM de EDTA (DOUGLAS; PICCIRILLO; TABRIZIAN, 2006). A integridade do DNA foi verificada após degradação da quitosana com quitosanase e lisozima, como descrito acima.

2.3.10. Citotoxicidade

2.3.10.1. Polímeros:

As citotoxicidades dos polímeros foram avaliadas por meio da determinação da viabilidade celular com ensaio de CellTiter96[®] aquoso não radioativo de proliferação celular (Promega Corporation), composto de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) e fenazina metassulfato (PMS). Para isso, os polímeros foram preparados em ácido acético (60 mM) em uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos sob agitação e aquecimento a 55 °C. Células de carcinoma cervical HeLa (FR-positivo) (America Type Culture cell Collection / Rockville, MD, USA) foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de O₂. No dia

seguinte, trocou-se o meio por novo meio DMEM suplementado e adicionaram-se diferentes quantidades das soluções de quitosanas e seus derivados, para concentrações finais de 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2 mg/mL e 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL, para lipofetamina. Cada concentração foi repetida em 3 poços, incubando-se por 24 horas. No último dia, o meio de cultura da placa foi trocado por meio DMEM contendo MTS e PMS, incubando-se por 30 minutos a 37 °C. MTS é biorreduzido pelas células viáveis para formazana solúvel em meio de cultura. A absorvância foi medida em 490 nm com um leitor de microplacas EL800 universal (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, EUA). A percentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

2.3.10.2. Poliplexos:

Para os poliplexos a citotoxicidade foi avaliada como descrito acima, e após o cultivo das células HeLa por 24 horas, o meio de cultura foi removido e 50 µL de DNA livre ou poliplexos (equivalente a 0,025 µg de DNA do plasmídeo), em diferentes razões N/P, foram adicionados às células com 100 µL de meio completo e incubou-se durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio com CellTiter96[®] aquoso não radioativo de proliferação celular (Promega Corporation), assim como para os polímeros. A percentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

2.3.11. Eficiência de transfecção

2.3.11.1. Estudo de Transfecção pelo plasmídeo VR1412

As células HeLa foram semeadas 24 horas antes da transfecção em placas de 24 poços a uma densidade de 50.000 células/poço em meio DMEM com 10% de FBS e 1% de PS. No dia da transfecção, as células foram lavadas com o meio de cultura, sem FBS e PS, e adicionou-se 200 µL de DNA livre ou 200 µL de poliplexos (5 µg de DNA/poço) e

adicionou-se 200 μ L de meio DMEM, sem FBS e PS. Após 4 horas de incubação a 37 °C, as células receberam 1 mL de meio completo com 10% de FBS e 1% de PS e foram incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio foi removido e adicionado um novo meio completo. Depois de 72 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) frio. Determinou-se a concentração da proteína β -gal expressa nas células utilizando-se o kit Elisa para β -gal (ROCHE). Para a determinação da concentração de proteínas totais aplicou-se o kit BCA baseado no ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão, de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de transfecção é dada a partir da razão entre a concentração de β -gal, em pg, e das proteínas totais, em mg.

2.3.11.2. Transfecção pelo siRNA-SSB

Para o estudo de transfecção com siRNA-SSB, cultivou-se 10^5 células por poço em placas de 6 poços com 3 mL de meio de cultura DMEM com 10% de FBS e 1% de PS a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de O₂. Após 24 horas, os poços foram lavados 3 vezes com meio DMEM novo, sem FBS e PS. Logo após, adicionou-se 500 μ L de poliplexos, contendo 5 μ g de siRNA-SSB, e 500 μ L de meio DMEM. Incubou-se por 4 horas a 37 °C, aplicou-se mais 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e incubou-se novamente por 24 horas. No dia seguinte, o meio contendo os poliplexos foi trocado por meio DMEM novo com suplementos. Após 48 horas, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e as células foram tratadas com o reagente TRIzol[®] para purificação de RNA, seguindo as instruções do fabricante (Ambion/RNA by life technologies). As amostras de RNA finais foram transcritas para cDNA com o kit de transcriptase reversa. A partir do cDNA de cada amostra, um quinto foi utilizado para PCR em tempo real. Os primers aplicados foram: SSB, sequência senso 5'-CCA AAA TCT GTC ATC AAA TTG AGT ATT-3' e sequência anti-senso 5'-CCA GCC TTC ATC CAG TTT TAT CT-3', GAPDH, sequência senso 5'-CCACCCATGGCAAATCCATGGCA-3' e sequência anti-senso 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAQCC-3'. GAPDH é o cDNA do RNAm que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e foi usado como padrão relativo, gene de referência, para os valores de SSB. O kit para PCR em tempo real utilizado foi o Quantitect SYBR Green PCR e o método para análise foi o Mx3000P (Stratagene, La Jolla, USA). Esse

método aplica a molécula SYBR Green que se liga a fita dupla de DNA, ligação não específica, e fluoresce. Dessa forma, pode-se monitorar o processo da reação de amplificação do cDNA, pois a intensidade de fluorescência aumenta proporcionalmente com o ciclo de amplificação. A fluorescência gerada no primeiro ciclo é chamada de Ct, e esse valor pode ser diretamente correlacionado com a concentração de partida da amostra. Com isso, os valores de expressão do RNAm SSB podem ser calculados a partir das mudanças relativas a células controle, sem tratamento com siRNA-SSB. A seguinte equação é utilizada para avaliar a porcentagem da expressão de RNAm SSB que foi bloqueada pelo siRNA-SSB, normalizada pelo GAPDH:

$$\text{Nível de expressão de RNAm SSB} = \frac{2^{-\Delta Ct(SSB)}}{2^{-\Delta Ct(GAPDH)}} \quad \text{equação 5}$$

em que $\Delta Ct(SSB)$ é a diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e a amostra tratada com siRNA para o cDNA do SSB, e $\Delta Ct(GAPDH)$ é a diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e para o cDNA do GAPDH.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos polímeros

Os policátions utilizados nesse trabalho foram separados em duas séries. A série I refere-se às quitosanas desacetiladas, degradadas e seus derivados contendo diferentes graus de substituição por grupos PC e DEAE (Tabela 2). Para a síntese dessa série, quitosana comercial foi desacetilada por hidrólise básica, como descrito no procedimento 3.3.1. Esse produto foi degradado com razões em massa de nitrito de sódio (mg) e quitosana (g) (NaNO_2/CH) de 6,33 e 49,6, obtendo-se quitosanas de Mw 29 e 12 kDa, respectivamente. Os derivados da série I foram obtidos a partir da modificação da quitosana desacetilada CH_{12} , inicialmente pela reação de substituição com grupos fosforilcolina (PC), seguida da reação de modificação com DEAE. O GD da quitosana de partida (CH_{12}) foi determinado a partir da integração da área do sinal referente ao grupo metila das unidades acetiladas em 2,5 ppm (Figura 14) comparado à integração dos sinais referentes ao hidrogênio anomérico (5,5 ppm) utilizando-se a relação :

$$GD = 100\% - \frac{I_{\text{CH}_3}}{3I_{\text{H}}} \times 100\% \quad \text{equação 6}$$

Os cálculos levaram a um GD de 98% e confirmam que duas reações consecutivas levam à quase completa desacetilação. As substituições por grupos PC foram realizadas por meio de reação com base de Schiff e o grau de substituição (GS-PC) foi determinado a partir das áreas dos sinais, devido a dois tipos de hidrogênios anoméricos, H e H^1 (Figura14), utilizando a equação (7). As amostras para a análise em RMN de ^1H (20 mg/mL) foram preparadas em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (100/1, v/v).

$$GS_{PC} = \frac{I_{H^1}}{I_{H^1} + I_H} \times 100\% \quad \text{equação 7}$$

Os valores do grau de substituição de PC (GS_{pc}) obtidos foram de 18 e 22%, e os derivados foram denominados respectivamente PC₁₈-CH e PC₂₀-CH (Tabela 2). Para obtenção de derivados com maiores graus de ionização (α) em pH fisiológico, os derivados substituídos com PC foram posteriormente modificados para introdução dos grupos DEAE via modificação química dos grupos amina no carbono C-2. Assim, por meio do controle do pH da reação, procurou-se evitar a reação dos grupos hidroxila que desempenham papel importante na atividade biológica da quitosana. O caminho de reação, além de introduzir grupos amina terciária na cadeia principal, converte as amins primárias de quitosana em amins secundárias, transformação essa que afeta o estado de protonação da quitosana. PC₁₈-CH e PC₂₀-CH foram modificados com DEAE utilizando razões de massa DEAE/CH de 0,26 a 2,0 (Tabela 2).

Tabela 2. Razões em massa de DEAE e de quitosana (DEAE/CH) que deram origem aos derivados com substituições por grupo DEAE da série I.

Polímero	DEAE/ PC-CH	GSdeae %	GSdeae _q %
PC ₁₈ -CH-DEAE ₂₂	0,26	22	--
PC ₁₈ -CH-DEAE ₃₈	0,50	38	--
PC ₁₈ -CH-DEAE ₄₄	0,60	44	--
PC ₁₈ -CH-DEAE ₇₀	1,00	58	12,0
PC ₂₀ -CH-DEAE ₁₀₀	2,00	97	26,7

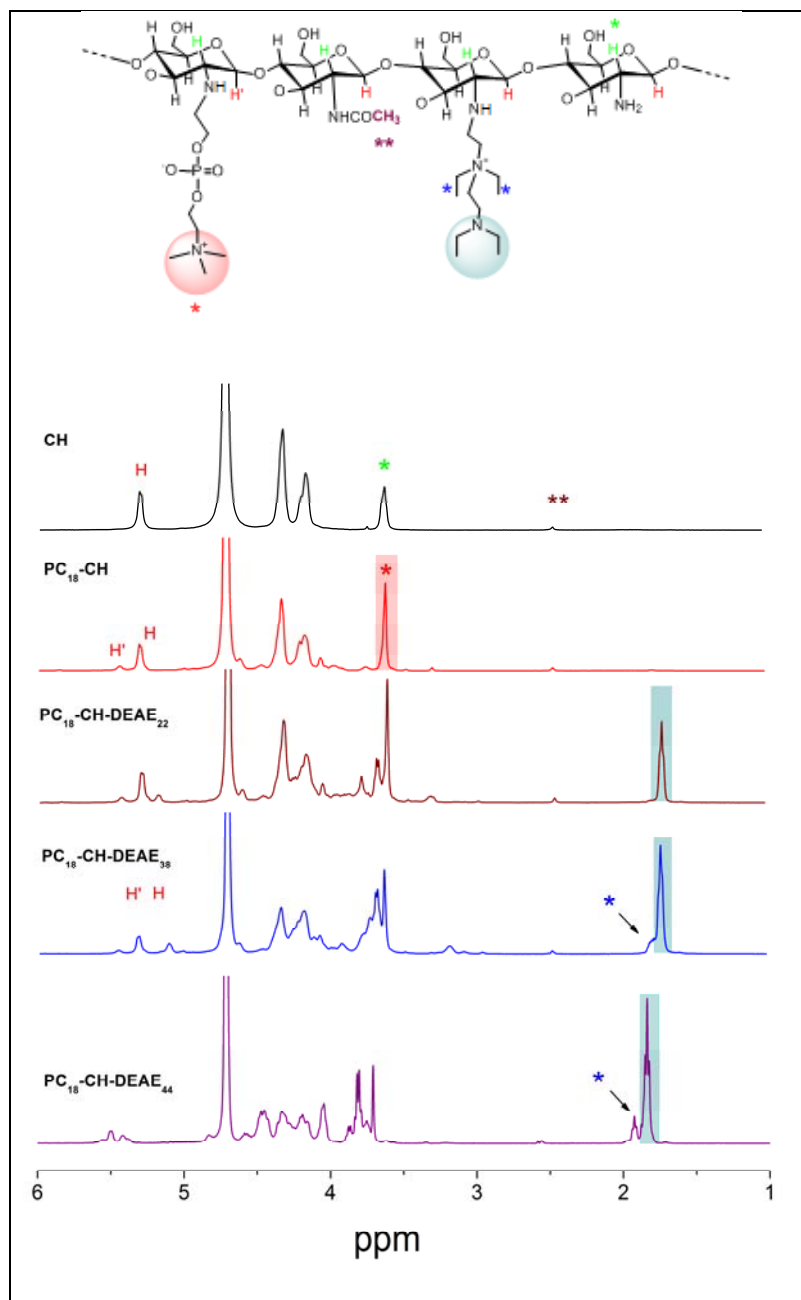


Figura 14. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos derivados de quitosana da série I ($\text{PC}_X\text{-CH-DEAE}_Y$) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (100/1, v/v) a 70°C .

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados substituídos com DEAE exibiram um singleto em 1,80 ppm, atribuído à ressonância dos hidrogênios dos grupos metila de dietetilamina e sinais de δ 3,70 a 4,00 ppm, que podem ser atribuídos aos hidrogênios dos metilenos de $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ e $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ respectivamente (Figura 14). Os graus de substituição por DEAE foram calculados utilizando a relação:

$$GS_{deae} = \frac{I_{CH_3/6}}{I_H + I_{H^1}} \quad \text{equação 8}$$

e os valores são apresentados na Tabela 3. Ambas as reações de substituição, com PC e DEAE, são nucleofílicas, e dois derivados resultados das substituições com maiores razões de DEAE/PC-CH (1,0 e 2,0) apresentam grupos amônio quaternários (δ 1,84 ppm, Figura 14), cujos graus de substituição foram determinados como 12 e 26,7%.

A massa molar ponderal média (Mw), massa molar numérica média (Mn) e o índice de polidispersividade (Mw/Mn) foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC). As curvas de GPC, titulação condutimétrica e RMN de ^1H e suas respectivas análises se encontram no apêndice A. Alguns polímeros das séries I e II foram selecionados para o estudo de transfecção com siRNA, modificação com o ligante PEG-FA e para o ensaio *in vivo* que foi iniciado recentemente. Essa seleção foi feita após os estudos de transfecção *in vitro* em células HeLa com o plasmídeo VR1412, sendo os polímeros selecionados aqueles mais eficientes no processo de transfecção. Os graus de substituição do ligante foram analisados pela absorvância do ácido fólico em 363 nm e coeficiente de absorvidade molar de $6165 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, usando a quitosana não modificada como branco/referência.

A análise comparativa dos resultados de massa molecular mostram que dois polímeros, PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, apresentaram valores marcadamente discrepantes com respeito a Mw. Um exame da literatura do comportamento de polímeros zwitteriônicos permite explicar parcialmente os resultados obtidos. Em soluções aquosas com baixa força iônica, as interações entre cargas positivas e negativas nas cadeias polianfóteras podem levar as cadeias de polímeros a formar estruturas retraídas e diminuir em tamanho (KUDAIBERGENOV, 2002). Por outro lado, interações intermoleculares também podem reduzir a solubilidade em água de polianfóteros em presença de baixa força iônica. Polianfóteros, tais como poli (*N*-3-sulfopropil-*N*-metacriloxietil-*N*, *N*-dimetil betaína), são insolúveis em água sem sal, devido à forte interação entre os pares iônicos das cadeias poliméricas (MATSUDA et al., 2008). Portanto, os valores de Mw para os dois polímeros mencionados se devem provavelmente a interações intermoleculares dos grupos zwitteriônicos da fosforilcolina.

Tabela 3. Propriedades das quitosanas e seus derivados da **série I**.

Polímero	GD (%)	Mw (kDa)	Mw/Mn	GS_{PC}[*] (%)	GS_{deae}[*] (%)	GS_{deaeq}[*] (%)	GS-PEG-FA^{**} (%)
CH^a	98	134	4,2	--	--	--	--
CH₁₂^b	98	12	1,9	--	--	--	--
CH₂₉^c	98	29	1,6	--	--	--	--
PC₂₀-CH	--	242	6,5	22	--	--	--
PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀	--	134	3,7	26	97	26,7	--
PC₁₈-CH^d	--	41	3,3	18	--	--	--
PC₁₈-CH-DEAE₂₂	--	29	2,3	18	22	--	--
PC₁₈-CH-DEAE₃₈	--	33	2,3	18	38	--	--
PC₁₈-CH-DEAE₄₄	--	32	2,4	18	44	--	--
PC₁₈-CH-DEAE₇₀	--	--	--	18	58	12,0	--
PC₁₈-CH₁₂-PEG-FA^d	--	--	--	18	--	--	2,4

Mw: Massa molar ponderal média (g.mol⁻¹); Mw/Mn: polidispersividade; GD: Grau de desacetilação (%); GS-PC: Grau de substituição por grupos PC (%); GS_{deae}: Grau de substituição por grupos DEAE (%); ^aQuitosana de partida para degradação. ^bQuitosana degradada para preparação de PC₁₈-CH and PC₁₈-CH-DEAE_x. ^cQuitosana degradada para a preparação de PC₂₀-CH and PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀. ^{*}GS obtidos a partir das análises de RMN de ¹H. ^{**}GS analisados por meio de medidas de absorvância do ácido fólico. ^d Polímeros selecionados para estudo com siRNA.

A partir das curvas de titulação potenciométrica, foi possível calcular a capacidade de tamponamento (CT) de cada derivado em função do pH (Figura 15). Observou-se que o derivado PC₁₈-CH obteve maior CT na faixa de pH entre 5 e 7,4, seguido da quitosana desacetilada e degradada CH₁₂. Os derivados contendo DEAE não aumentaram CT. Comparando as CT dos derivados PC₂₀-CH e PC₁₈-CH, observou-se que a CT é maior para o derivado de menor massa molar. Provavelmente, polímeros com menor massa molar deixam os grupos aminas mais disponíveis para a protonação, aumentando a CT. Esse aumento na

capacidade de tamponamento com a diminuição da massa molar do polímero também foi observado por Mady e colaboradores no estudo de PEI (MADY et al., 2011).

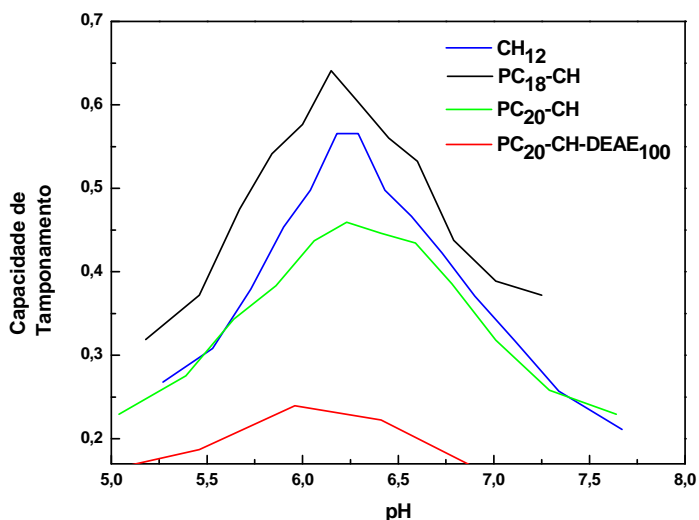


Figura 15. Capacidades de tamponamento dos derivados da série I em função do pH.

A segunda série (série II) abrange quitosana desacetilada e derivados contendo proporções crescentes de DEAE, preparadas no trabalho de mestrado de Franciele de Paula Pansani Oliveira em 2011 (OLIVEIRA, F. D. P. P., 2011) (Tabela 4). Os derivados da série II contêm diferentes GS de aminas terciárias, 14,9%, 24,5%, 62,5% e 97,6% (Tabela 3). Os derivados denominados CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀, contêm grupos amina quaternária, com GS de 15,5% e 16,9% respectivamente. A CT para CH₁₇, CH-DEAE₁₅, CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ aumenta até CH-DEAE₂₅ e volta a diminuir para os derivados mais substituídos, ligando, respectivamente, 0,61, 2,81, 4,5, 2,27 e 1,41 mmol de prótons por grama de polímero. Portanto, CT aumenta em comparação à quitosana desacetilada (Apêndice B) (OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013) e o decréscimo de CT para CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀, em parte, pode ser atribuído aos grupos amina quaternária e ao aumento do grau de ionização em pH 7,4 (OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013).

Tabela 4. Propriedades da quitosana desacetilada seus derivados da série II substituídos com DEAE.

Polímero	GD (%)	Mw (kDa)	Mw/Mn	GSdeae* (%)	GSdeae _q ** (%)	GS-PEG-FA*** (%)
CH ₁₇ ^a	95	256	3,7	--	--	--
CH-DEAE ₁₅ ^{b,c}	--	238	3,7	14,9	--	--
CH-DEAE ₂₅	--	219	4	24,5	--	--
CH-DEAE ₈₀	--	234	4,4	62,5	15,5	--
CH-DEAE ₁₀₀ ^b	--	197	2,7	97,6	16,9	--
DEAE ₁₅ -CH-PEG-FA ^{b,c}	--	--	--	14,9	--	2,7

^aQuitosana desacetilada de partida para o preparo dos derivados CH-DEAEy. *GS = grupos amina terciária, obtidos a partir das análises de RMN de ¹H; **GSdeae_q: Grupos amina quaternária; ***GS analisados por meio de medidas de absorvância do ácido fólico. ^bPolímeros selecionados para estudos com siRNA. ^cPolímeros selecionados para o teste *in vivo*.

3.2. Estudo da Interação dos Derivados com o plasmídeo VR1412

Todos os derivados estudados formaram NPs com o plasmídeo VR1412 (pDNA) em diferentes razões N/P. As partículas formadas com a série I foram preparadas nos pHs 6,3 e 7,4 e as da série II, nos pHs 5,0 e 7,4. O tamanho e o potencial zeta dos políplexos foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e a estabilidade e força de interação foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose. A eficiência de transfecção é fortemente correlacionada com a estabilidade e potencial zeta dos políplexos (HUANG et al., 2005; KOPING-HOGGARD et al., 2001). Além disso, políplexos de tamanhos variando entre 200 e 600 nm não têm grande influência na eficiência de transfecção e podem ser captados por endocitose pelas células (KOPING-HOGGARD et al., 2001; LAVERTU et al., 2006).

3.2.1. Tamanho e potencial zeta

Os derivados da série I formam partículas de tamanhos variados com o pDNA que dependem da composição, do pH e da razão N/P (Figura 16a e 16b). Em pH 6,3, CH₁₂ complexou o pDNA e formou partículas de em torno de 480 nm de diâmetro em toda a faixa de razão N/P estudada, ou seja, de 2 à 30. Entretanto, para os derivados, verifica-se que quanto maior o GSdeae, menor é o tamanho das partículas formadas. Para N/P > 5 o diâmetro hidrodinâmico permaneceu em torno de 100 a 120 nm (Figura 16a).

Na figura 16b estão apresentados os resultados para os diâmetros hidrodinâmicos das partículas em pH 7,4. O aumento do pH para 7,4 tem como consequência a desprotonação parcial dos grupos amino dos derivados e resulta num decréscimo na força de interação, afetando o tamanho das NPs. Para o derivado PC₂₀-CH, o tamanho das partículas aumenta até razão N/P 3,0 e volta a diminuir formando poliplexos com tamanhos de 190 nm na razão N/P 10. Este comportamento se deve à carga superficial das NPs, que atinge valores ligeiramente positivos somente a partir de N/P > 5,0 (Figura 17b). O derivado de menor Mw, PC₁₈-CH, interage mais fracamente com o pDNA e, para razões N/P maiores que 4, formou nanopartículas com diâmetros da ordem de 400 nm. Por outro lado, em pH 7,4 a quitosana desacetilada não forma partículas estáveis precipitando em solução. Para os derivados contendo DEAE, o tamanho das partículas diminui com o grau de substituição e, para N/P > 2, o derivado PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ formou NPs da ordem de 180 nm. Já os derivados PC₁₈-CH-DEAE₄₄ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀, formaram, em baixos valores N/P, nanopartículas com diâmetros de 420 e 335 nm respectivamente, e 180 nm para N/P = 20 (Figura 16b).

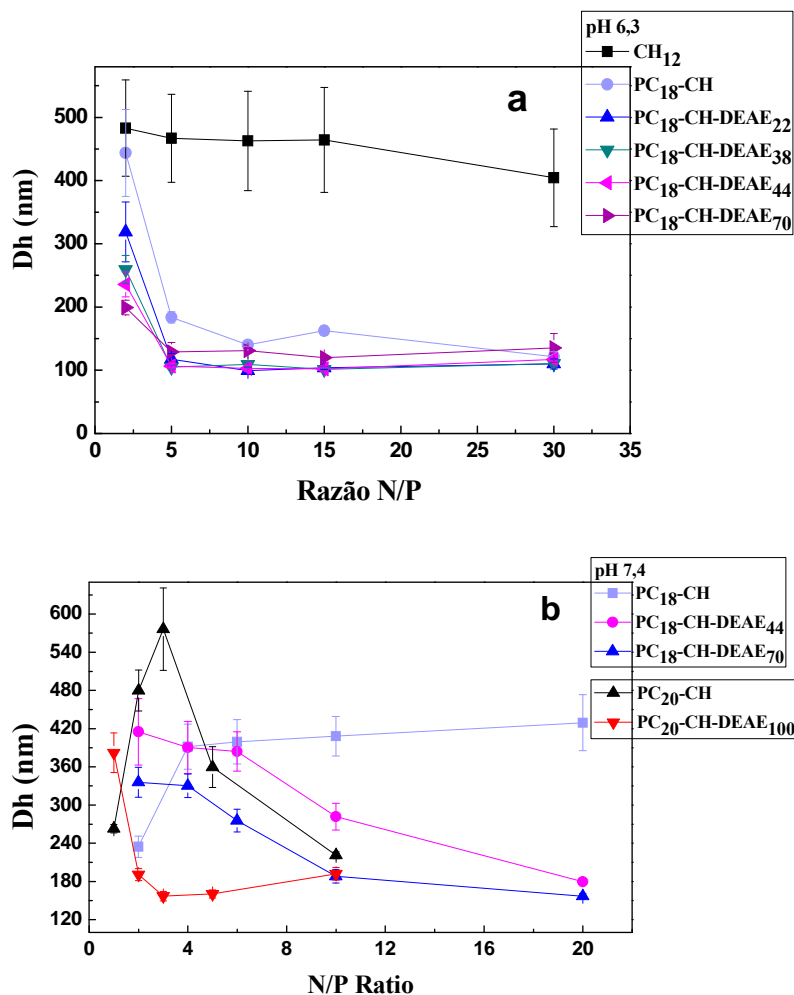


Figura 16. Diâmetros hidrodinâmicos dos políplexos de plasmídeo formados com os polímeros da série I em a) pH 6,3 e b) pH 7,4. Os valores correspondem as médias de duas preparações independentes, com três medidas consecutivas cada.

As Figuras 17a e 17b mostram o potencial zeta das NPs da série I em função da razão N/P. Nos dois pHs estudados o potencial zeta dos complexos aumenta com N/P e com o GS por DEAE. Em pH 6,3, CH₁₂, forma partículas com -1,6 mV para 2 N/P e aumenta até +14,9 mV para N/P = 15. Já, os seus derivados formaram complexos com potencial zeta positivo de +5 mV a partir de N/P 2 para PC₂₀-CH, atingindo +22 mV na razão 15 para os derivados substituídos por DEAE (Figura 17a). Os maiores valores de potencial zeta para PC₂₀-CH e os demais derivados se devem aos maiores valores de pKa para os grupos amina secundária (pKa ~ 7,0 (TIERA et al., 2006)). O efeito da modificação com DEAE se torna mais evidente em pH 7,4 e somente os derivados formam partículas com potencial zeta positivo acima de 5 mV. O derivado PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ foi o único da série I que, nas razões N/P 5 e 10, formou políplexos positivos com potenciais acima de 10 mV (Figura 17b). Valores positivos de

potencial zeta conferem maiores estabilidades coloidais às NPs, que, para razões $N/P \geq 10$, exibiram raios hidrodinâmicos que variaram de 120 a 300 nm (Figura 16b).

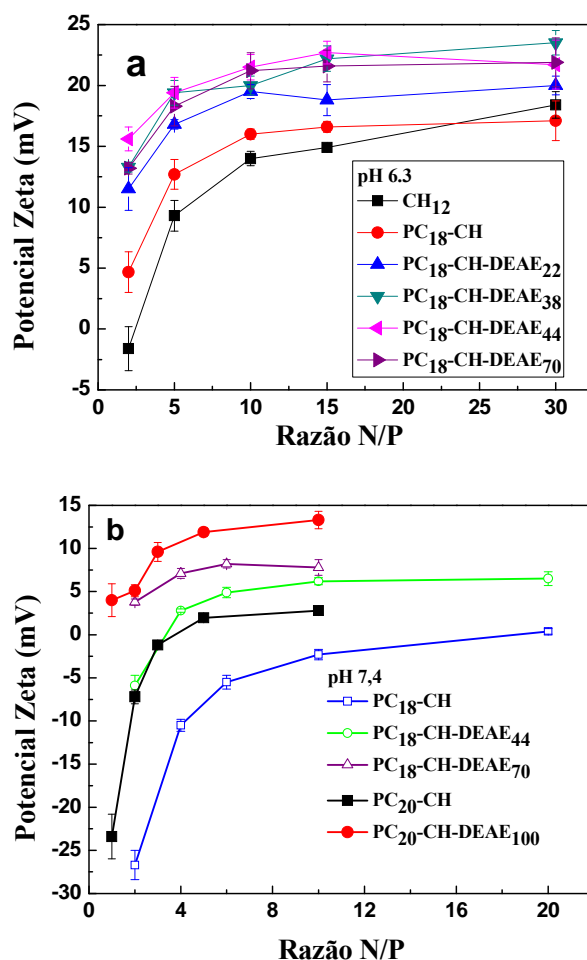


Figura 17. Potenciais zeta dos políplexos de plasmídeo formados com os derivados da série I em a) pH 6,3 e b) pH 7,4.

A partir dos resultados, observa-se que o tamanho das partículas está diretamente correlacionado com o potencial zeta. Isso pode ser visualizado pelo comportamento da curva para o derivado PC₂₀-CH (Figura 16). No pH 7,4, ocorre um pico em $N/P = 3,0$, sendo que, abaixo dessa razão, o potencial zeta é negativo e acima de 3,0, torna-se positivo. Na razão $N/P = 3,0$, as partículas são menos estáveis e podem agregar, formando partículas maiores. Esse mesmo efeito foi observado por Patrick et al. em 1998 (ERBACHER et al., 1998). Nimesh e colaboradores também verificaram que o tamanho das partículas diminui com aumento do potencial zeta e depende da força iônica e do pH do meio (NIMESH et al., 2010).

Para os polímeros da série II, as NPs foram preparadas nos pHs 5,0 e 7,4 (Figura 18). Em pH 5,0, tanto quitosana (CH₁₇) quanto os derivados formaram NPs com diâmetros hidrodinâmicos (Dh) variando de 150 a 200 nm. Para CH₁₇, o tamanho se estabiliza para razões N/P acima de 3 e para os derivados contendo DEAE para N/P > 2. Para N/P < 2,0, os diâmetros das partículas foram de aproximadamente 600 nm. Em pH 5,0 e N/P ≤ 2,0, todas as quitosanas apresentam alto grau de ionização e NPs obtidas apresentam Dh maiores que 500 nm. Esse resultado pode ser atribuído aos baixos valores de potenciais zeta das NPs, que para N/P > 3,0 aumenta abruptamente, devido à adsorção do excesso de policação levando à formação de uma carga superficial positiva (~ 20 mV), com uma consequente diminuição nos valores de Dh para 150 nm (Figura 18b). Em pH 7,4, um comportamento similar foi observado, entretanto quitosana desacetilada (CH₁₇) formou NPs de 200 nm somente para razão N/P 20 (Tabela 5). Para os demais derivados da série II, partículas menores (200-300 nm) são formadas para razões N/P > 6. Os derivados com maiores GS, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ formaram partículas menores (Dh ~ 200 nm), devido ao maior grau de ionização em pH 7,4 (Tabela 5)(OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013).

Na Tabela 5, verifica-se que o aumento do GS aumenta o potencial zeta dos políplexos, devido ao alto grau de ionização desses derivados em pH 7,4. Acima de N/P = 4, os derivados CH-DEAE₁₅, CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ geraram políplexos com potenciais zeta positivos de 4,7, 7,5, 8,9 e 14,2 mV respectivamente, enquanto a quitosana desacetilada, CH₁₇, atingiu somente 2,5 mV na razão N/P 10. Isso se deve ao baixo grau de ionização da quitosana desacetilada em pH 7,4, que é próximo de zero.

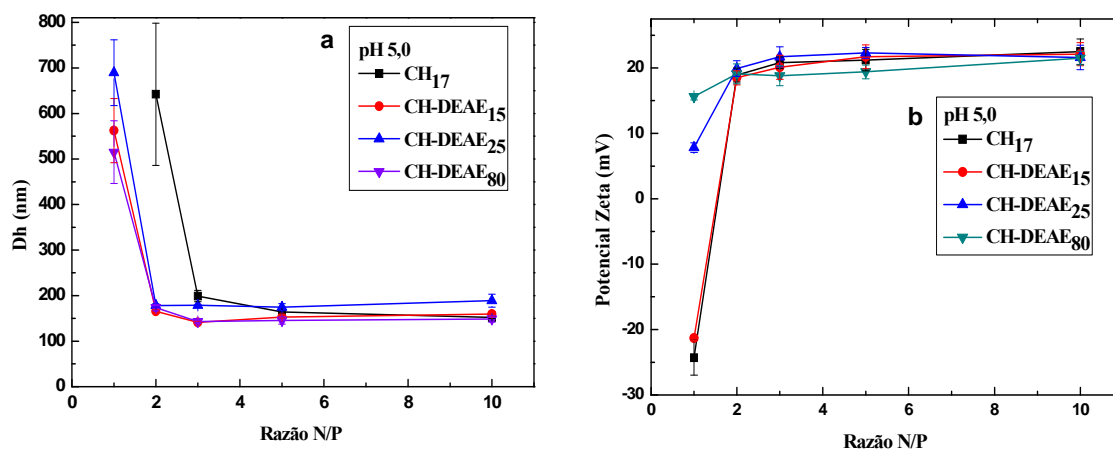


Figura 18. a) Diâmetros hidrodinâmicos e b) potencial zeta dos políplexos de plasmídeo formados com polímeros da série II em pH 5,0.

Tabela 5. Valores de diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta para as NPs formadas em pH 7,4 com os derivados da serie II (CH-DEAEx).

N/P	CH ₁₇		CH-DEAE ₁₅		CH-DEAE ₂₅		CH-DEAE ₈₀		CH-DEAE ₁₀₀	
	Dh	Zeta (mV)	Dh	Zeta (mV)	Dh	Zeta (mV)	Dh	Zeta (mV)	Dh	Zeta (mV)
4	506(±80)	-2.2(±1,4)	472(±51)	2.7(±0,6)	295(±45)	5.4 (±0,8)	204(±8)	9.2(±0,6)	200(±6,5)	14.2(±0,8)
6	444(±62)	1.9(±1,3)	294(±3,0)	4.7(±0,4)	244(±20)	7.5 (±0,8)	229(±10)	8.9(±0,76)	205(±6,0)	14.2(±0,7)
10	364(±34)	2.5(±1,2)	235(±5,0)	5.3(±0,5)	277(±32)	8.3(±0,7)	236(±43)	11.5(±0,9)	208(±5,5)	15.0(±0,9)
20	247(±18)	1.3(±0,5)	250(±13)	6.3(±0,3)	299(±47)	9.3(±0,9)	207(±5,5)	12.8(±0,5)	212 (±17)	15.2(±1,0)

O tamanho das NPs preparadas com os derivados das séries I e II foram avaliados em função do tempo em pH 7,4 e N/P 2,0 (Figura 19). Os diâmetros aumentam em função do tempo para todos os polímeros, exceto para PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ e CH-DEAE₁₀₀. Inicialmente, as partículas apresentam Dh em torno de 300 nm e, após 5 horas do preparo com PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₇₀ e PC₂₀-CH, os diâmetros aumentaram para 2, 1,3 e 0,75 μm , respectivamente (Figura 19a). Para os derivados da série II, pode-se verificar que, quanto maior o GSdeae, mais estáveis são os tamanhos dos poliplexos em função do tempo. Logo após o preparo desses complexos, os diâmetros variaram de 200 a 500 nm. Depois de 4 horas, os poliplexos formados com CH-DEAE₁₅, CH-DEAE₂₅ e CH-DEAE₈₀ chegaram a diâmetros de 2,2, 2,4 e 1,8 μm , respectivamente, não havendo grandes variações no tamanho das partículas formadas com CH-DEAE₁₀₀ (Figura 19b).

Portanto, o tamanho e a estabilidade das partículas estão relacionados ao potencial zeta dessas. Em pH 7,4 e N/P = 2, o potencial zeta é maior para as partículas preparadas com polímeros com maiores valores de GSdeae. Além disso, deve-se considerar que a força iônica do meio de 150 mM afeta a interação entre os polieletrólitos. Os derivados de baixa massa molar, PC₁₈-CH e PC₁₈-CH-DEAE₇₀, competem com os íons de sal na interação com o pDNA, interagindo mais fracamente e formando partículas menos estáveis em função do tempo (PICOLA et al., 2012; WARD et al., 2001).

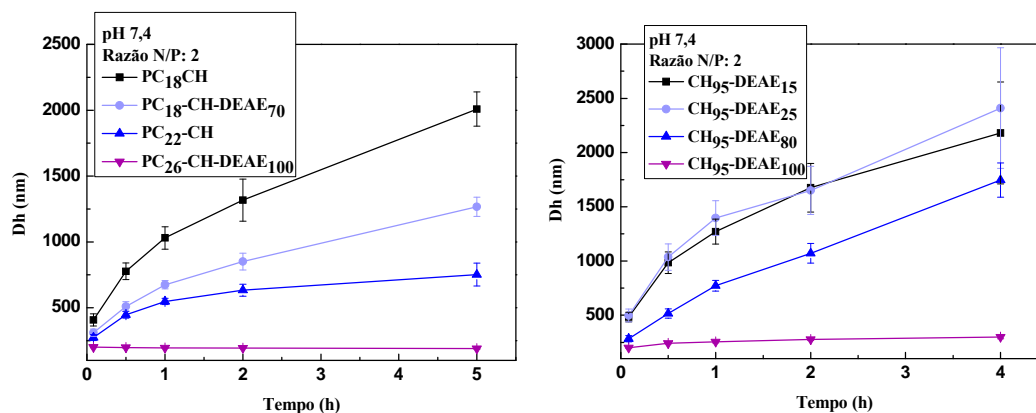


Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico dos poliplexos de plasmídeos formados com derivados da série I (a) e da série II (b) em pH 7,4 e em função do tempo em minutos.

3.2.2. Eletroforese

No estudo de eletroforese, a força de interação e a estabilidade das nanopartículas foram avaliadas submetendo as partículas à eletroforese em gel de agarose. A estabilidade e a integridade do plasmídeo VR1412 foram verificadas por meio de eletroforese (Figuras 20 e 21) com NPs preparadas em pH de 6,3 e 7,4, respectivamente.

Em pH 6,3, as NPs de PC₁₈-CH e PC₁₈-CH-DEAE₂₂ não liberam o pDNA para N/P > 5 (Figura 20a e 20b). Entretanto, para as NPs de PC₁₈-CH-DEAE₃₈ e PC₁₈-CH-DEAE₄₄, o pDNA fica retido para N/P > 2 (Figura 20c e 20d), indicando que, quanto maior o GS_{deae}, mais eficiente é a interação entre pDNA e os policátions. A Figura 20e mostra a liberação de pDNA após a digestão com lisozima e quitosanase dos poliplexos formados com PC₁₈-CH respectivamente, e nota-se claramente a integridade do pDNA após digestão de poliplexos preparadas com PC₁₈-CH em todas as razões N/P estudadas (2, 5, 10, 20 e 30).

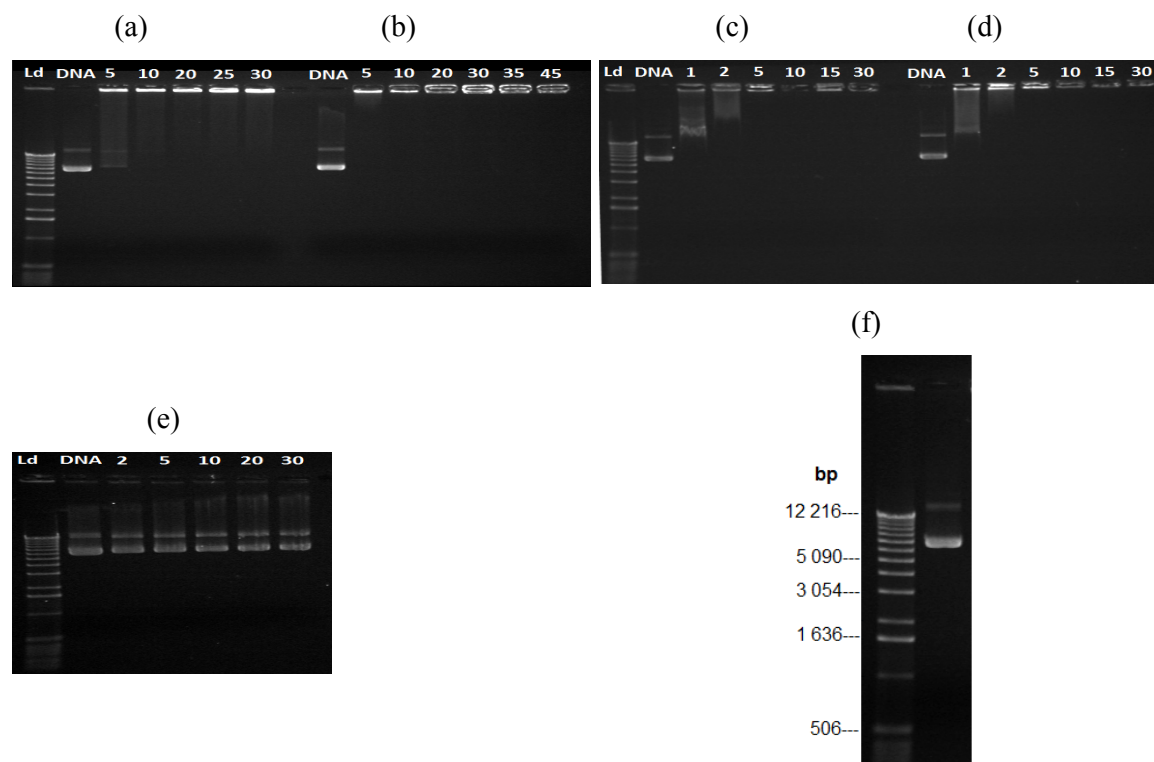


Figura 20. Eletroforeses dos políplexos preparados com plasmídeo VR1412 e (a) PC₁₈-CH, (b) PC₁₈-CH-DEAE₂₂, (c) PC₁₈-CH-DEAE₃₈ e (d) PC₁₈-CH-DEAE₄₄ em pH 6,3. (e) eletroforese dos políplexos preparados com CH₁₂-PC₁₈ após a digestão com lisozima e quitosana no mesmo pH. As razões N/P são indicadas acima de cada poço, Ld = Ladder, DNA = plasmídeo livre. (f) eletroforese de 1 kb ladder com os marcadores de peso molecular e do plasmídeo VR1412.

Em pH 7,4, o derivado PC₁₈-CH foi eficiente na formação de complexos e não liberou completamente o pDNA para razões N/P > 10 (Figura 21a). Já, o derivado contendo 44% de GSdeae, PC₁₈-CH-DEAE₄₄, complexou o pDNA, e não houve liberação em toda a faixa de razão N/P, ou seja, de 2 a 30 (Figura 21b). Os derivados PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ que apresentam maiores Mw também foram eficientes em complexar o pDNA em pH 7,4, e o pDNA ficou completamente retido nas razões N/P 3 e N/P 1 respectivamente (21c e 21d). O conteúdo de DEAE nos polímeros intensifica a interação eletrostática entre os polieletrólitos em pH 7,4, havendo maior estabilidade em baixas razões N/P, o que pode ser atribuído ao alto grau de ionização dos derivados em pHs neutros. Além do grau de ionização, Mw é um parâmetro importante na formação de complexos. PC₂₀-CH, que tem maior massa molecular que PC₁₈-CH, forma NPs mais estáveis em menores razões N/P

(Figuras 21a e 21c). Os resultados tanto em pH 6,3 como 7,4 são similares àqueles encontrados na literatura para quitosana de diferentes GD e massas molares. A estabilidade dos poliplexos é dependente da razão N/P, do pH, do grau de ionização e da massa molar dos polímeros (KÖPING-HÖGGÅRD et al., 2003; PICOLA et al., 2012; RICHARDSON et al., 1999; STRAND et al., 2005).

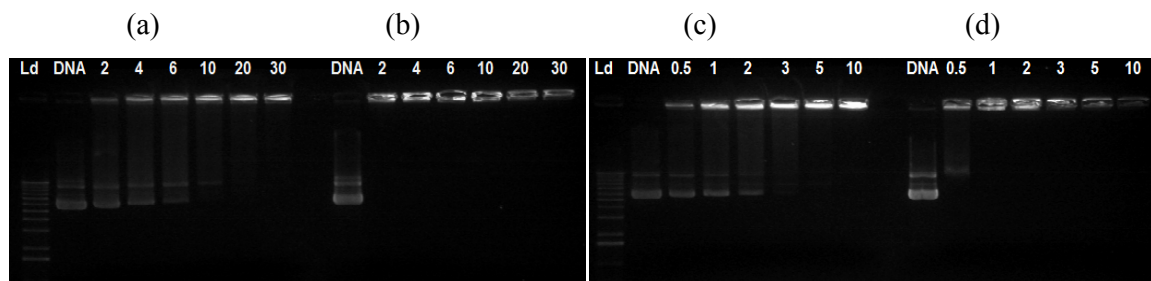


Figura 21. Eletroforeses dos poliplexos preparados com Plasmídeo VR1412 e (a) PC₁₈-CH, (b) PC₁₈-CH-DEAE₄₄, (c) PC₂₀-CH and (d) PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4. As razões N/P são indicadas acima de cada poço.

A proteção do DNA contra degradações por endonucleases é um parâmetro muito importante no planejamento da produção de vetores não virais para a terapia gênica. A integridade do pDNA, após a formação dos poliplexos, foi avaliada por meio da adição da enzima DNaseI às partículas contendo pDNA. Após a inativação da DNaseI, os polímeros sofreram degradação com lisozima e quitosanase, e a integridade do DNA foi verificada por eletroforese. A Figura 22 mostra o Ladder na coluna **A**, o pDNA livre na coluna **B**, a degradação do pDNA livre na coluna **C**, sem polímero, o poliplexo formado com PC₁₈-CH na coluna **D**, liberação do pDNA após degradação do polímero com lisozima e quitosanase na coluna **E**, sem adição de DNaseI. Nas colunas **G** (2,5u de DNaseI) e **I** (5u de DnaseI) é mostrado o DNA liberado da NPs após o tratamento com DNaseI e após a degradação com lisozima. Portanto, as NPs formadas com PC₁₈-CH (colunas **F** e **H**), proporcionam a proteção necessária ao pDNA para N/P = 10. Nas colunas **J** a **O** estão os poliplexos formados com PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, observa-se que o pDNA não foi liberado dos poços do gel agarose, mesmo depois da digestão com lisozima e quitosanase. Isso pode ter ocorrido pela presença de DEAE na cadeia polimérica da quitosana, que deve dificultar a sua degradação.

O mesmo estudo de integridade do pDNA foi realizado com os derivados CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA (Figuras 23 e 24). Assim como os resultados observados

para o derivado PC₁₈-CH, CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA foram capazes de proteger o pDNA contra degradações por DNaseI e pode-se verificar facilmente a integridade do pDNA por meio dos resultados de eletroforese (Figuras 23 e 24). Esses resultados de integridade do DNA contra degradação por DNaseI mostram-se coerentes com os obtidos na literatura com NPs preparadas com quitosanas de diferentes massas moleculares (CENTELLES et al., 2008) e com adições de alginato (YANG et al., 2010). Ademais, a diferença nas bandas do pDNA das colunas **B** e **E**, das Figuras 22, 23 e 24, se deve a mudança de sua conformação pelo conteúdo de quitosanase na coluna **E**, como verificado por Hoggard e colaboradores (KOPING-HOGGARD et al., 2001).

Portanto, verifica-se que a integridade do pDNA não foi afetada ao formar complexos com os polímeros após as modificações feitas na quitosana com PC e baixo GSdeae. No entanto, derivados contendo alto GSdeae mostram-se não degradáveis pela enzima lisozima e quitosanase, indicando que altos GSdeae podem interferir na biodegradabilidade do polímero.

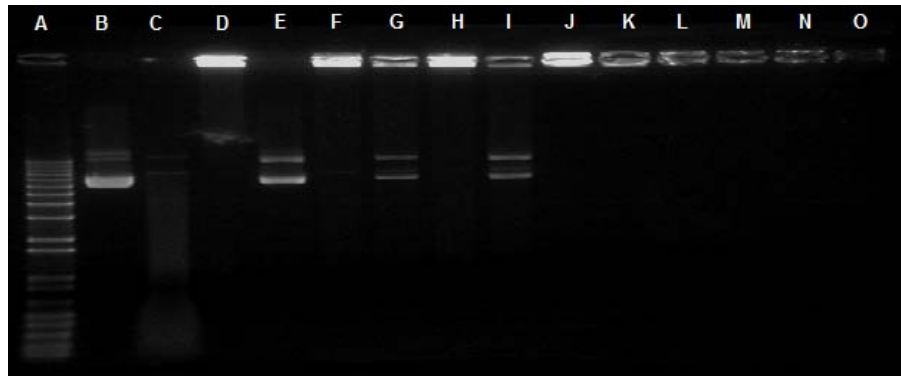


Figura 22. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação por DNaseI com políplexos de PC₁₈-CH/pDNA na razão 10 N/P (colunas D à I) e de PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀/pDNA na razão 2 N/P (colunas J à O). A) Ladder, B) pDNA livre, C) pDNA + 2,5u de DNaseI, D) políplexo PC₁₈-CH/pDNA na razão 10 N/P, E) políplexo + quitosanase + lisozima, F) políplexo + 2,5u DNaseI, G) políplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase + lisozima, H) políplexo + 5u DNaseI, I) políplexo + 5u DNaseI + quitosanase + lisozima, J) políplexo PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀/plasmídeo na razão N/P 3, K) políplexo + quitosanase + lisozima, L) políplexo + 2,5u DNaseI, M) políplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase + lisozima, N) políplexo + 5u DNaseI, O) políplexo + 5u DNaseI + quitosanase + lisozima.

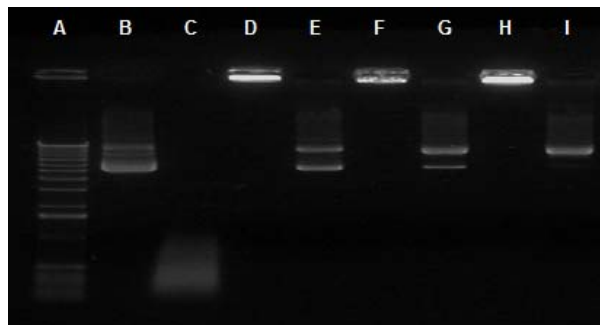


Figura 23. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação por DNaseI em poliplexos formados com CH-DEAE₁₅ na razão N/P 2. A) Ladder, B) plasmídeo livre, C) plasmídeo + 2,5u de DNaseI, D) poliplexo, E) digestão do poliplexo com quitosanase, F) poliplexo + 2,5u DNaseI, G) poliplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase, H) poliplexo + 5u DNaseI, I) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase.

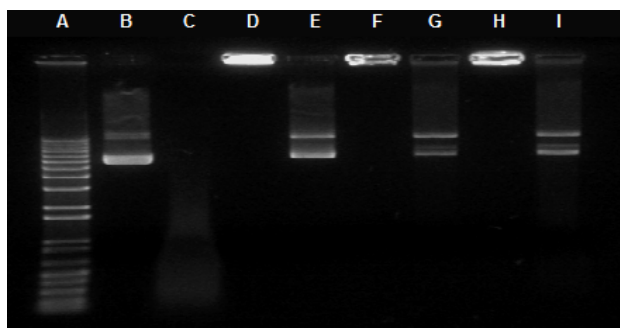


Figura 24. Eletroforese mostrando a integridade e a proteção do DNA contra degradação com DNaseI em poliplexos formados com FA-PEG-CH-DEAE₁₅ na razão N/P 2. A) Ladder, B) plasmídeo livre, C) plasmídeo + 2,5u de DNaseI, D) poliplexo, E) digestão do poliplexo com quitosanase, F) poliplexo + 2,5u DNaseI, G) poliplexo + 2,5u DNaseI + quitosanase, H) poliplexo + 5u DNaseI, I) poliplexo + 5u DNaseI + quitosanase.

3.3. Estudo da Interação dos Derivados com o RNA de interferência (siRNA-SSB).

3.3.1. Tamanho e potencial zeta

A força de interação entre o polícatión e siRNA é crucial, já que, além de controlar a capacidade do polímero em proteger o siRNA da degradação, o processo de entrega envolve quebrar interações eletrostáticas de moléculas de siRNA separando-as das cadeias dos polícatións. Neste aspecto, a Mw dos polímeros desempenha um papel importante na estabilidade das NPs bem como para a eficiência da entrega. Experimentos *in vitro* mostram que o silenciamento gênico mediado por NPs é fortemente dependente do Mw do polímero (MALMO et al., 2012), mas uma tendência clara não pode ser indicada, e os resultados podem variar, dependendo da estrutura do polícatión.

Alguns polímeros das séries I e II foram selecionados para o estudo da formação de complexos com siRNA-SSB. Em pH 6,3, a quitosana desacetilada, CH₁₂, na razão N/P 20, formou poliplexos com Dh em torno de 600 nm e para N/P > 20, em torno de 100 nm. A quitosana modificada com PC, PC₁₈-CH, formou complexos com siRNA-SSB com Dh em torno de 100 nm em toda a faixa de razão N/P estudada, de 20 a 180 (Figura 25a). O potencial zeta dos poliplexos formados com PC₁₈-CH alcançou +19 mV na razão N/P 20 e 30 mV na razão N/P 100 (Figura 25b). O derivado CH-DEAE₁₀₀ formou complexos com o siRNA e o Dh atingiu valores ao redor de 150 nm na faixa de razão N/P entre 20 e 100 (Figura 25c).

Os tamanhos das NPs formadas com siRNA-SSB também foram avaliados em função do tempo, em pH 6,3 com CH-PC₁₈ e em pH 5,0 com CH-DEAE₁₅, na razão N/P 20 (Figura 26). Os valores de Dh para os poliplexos formados com CH-DEAE₁₅ não variou significativamente, ficando em torno de 180 nm, mesmo após 24 horas do seu preparo. Para o derivado PC₁₈-CH, verifica-se que o tamanho aumentou de 90 para 190 nm após 24 horas.

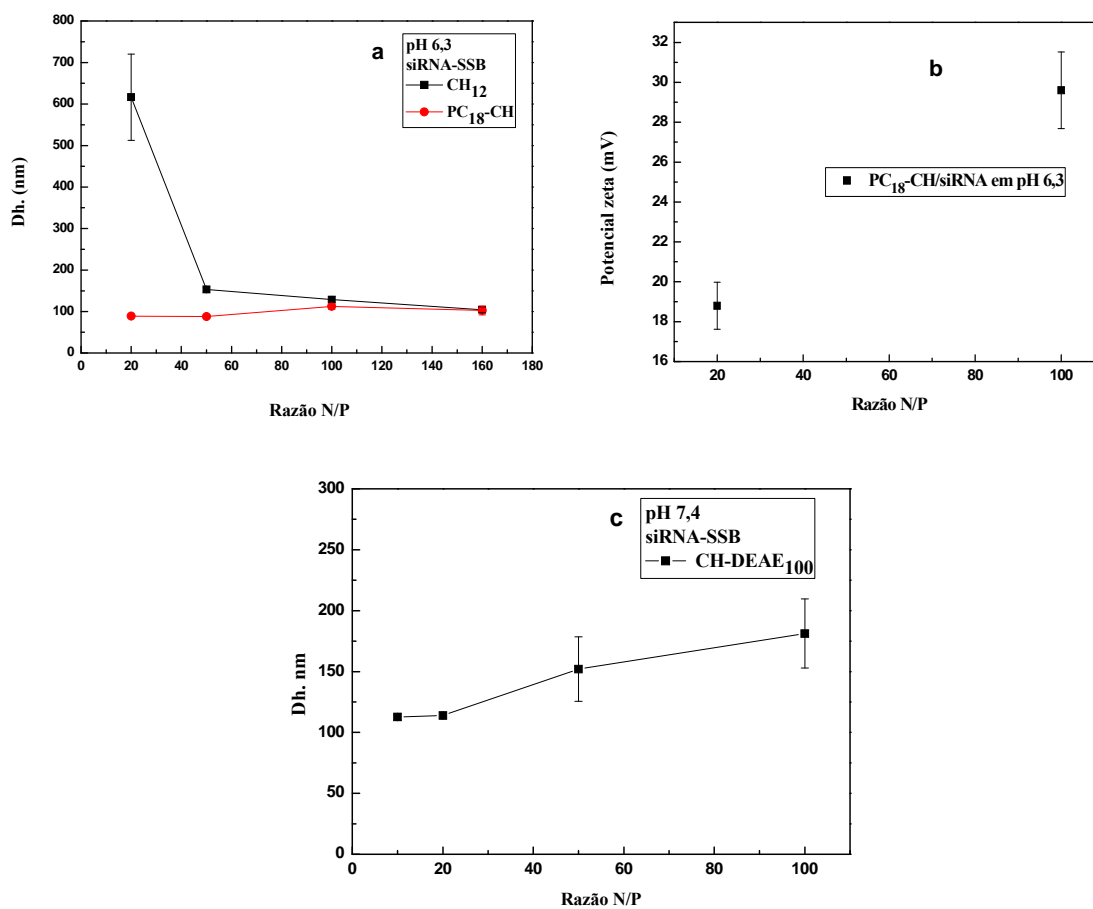


Figura 25. Diâmetros hidrodinâmicos dos políplexos de siRNA-SSB formados com quitosana desacetilada (CH₁₂) e PC₁₈-CH em pH 6,3 (a). Potencial zeta para os políplexos formados com o derivado PC₁₈-CH nas razões N/P 20 e 100 (b); e Diâmetros hidrodinâmicos dos políplexos de siRNA-SSB formados com CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4 (c).

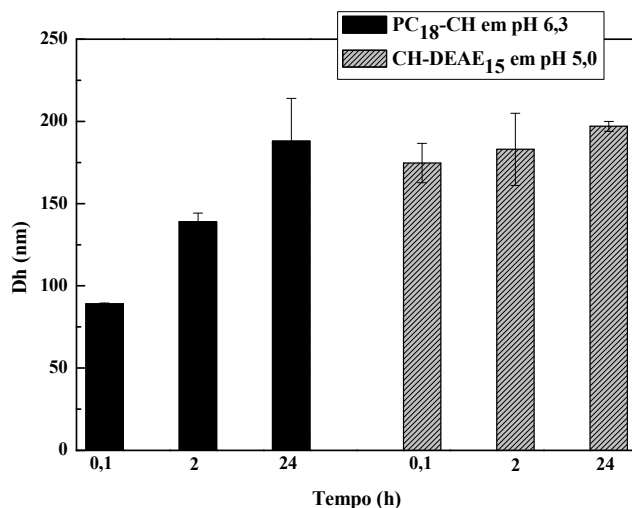


Figura 26. Diâmetros hidrodinâmicos dos poliplexos de siRNA-SSB formados com os derivados (■) PC₁₈-CH em pH 6,3 e (▨)CH-DEAE₁₅ em pH 5,0 em função do tempo em horas, na razão N/P 20.

O tamanho e o potencial zeta das partículas de siRNA-SSB preparadas com CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA foram medidos também em pH 6,3 e estão apresentados nas Figuras 27a e 27b. Para N/P = 1, o potencial zeta é negativo, -24 mV, e o tamanho das partículas formadas com CH-DEAE₁₅ foi de 600 nm. Para N/P >2 o Dh foi de 100 nm e o potencial zeta atingiu valores acima de + 10 mV (Figura 27a). O derivado contendo o ligante folato, DEAE₁₅-CH-PEG-FA, formou poliplexos de 100 nm de diâmetro em toda a faixa de N/P de 1 a 10 e com potenciais zeta acima de + 10 mV, chegando a + 22 mV para N/P = 10 (Figura 27b).

Os valores de Dh para partículas formadas com CH₁₂ são similares aos encontrados na literatura. Para a formação de partículas estáveis com quitosanas de baixa massa molar, são necessárias altas razões N/P para obtenção de partículas menores que 200 nm (FERNANDES et al., 2012; LIU, X. et al., 2007). Entretanto, partículas de tamanhos menores que 200 nm foram obtidas com menores razões N/P com quitosana modificada com PC, PC₁₈-CH. Além disso, obteve-se NPs de Dh ≈ 100 nm para os derivados contendo DEAE, CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA, com baixas razões N/P (2 a 5), resultados concordantes com os da literatura para quitosanas de massas molares entre 40 e 140 kDa nas razões N/P 4 e 8 (HOLZERNY et al., 2012).

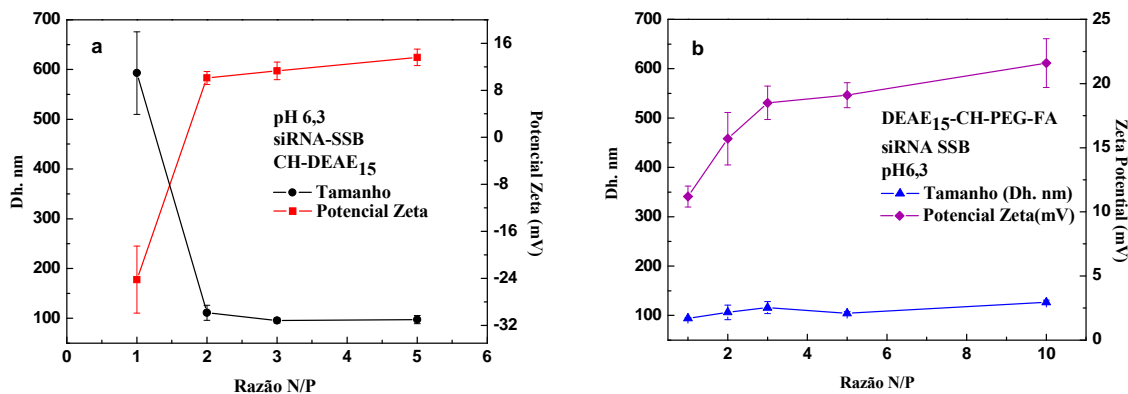


Figura 27. Diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta dos políplexos de siRNA-SSB formados com (a) CH-DEAE₁₅ e (b) DEAE₁₅-CH-PEG-FA em pH 6,3.

3.3.2. Eletroforese

As nanopartículas de siRNA-SSB foram preparadas com PC₁₈-CH em pH 6,3 e CH-DEAE₁₅ e CH-DEAE₁₀₀ em 7,4, e suas capacidades de complexação e estabilidades foram analisadas por meio da eletroforese. O tempo comum para um experimento de eletroforese é de 30 min. Os experimentos iniciais mostraram que, para as partículas preparadas com o derivado PC₁₈-CH, todo o siRNA-SSB era liberado em todas as razões N/P estudadas, ou seja, de 2 à 50. Portanto, analisou-se a corrida do siRNA-SSB em função do tempo. Assim, pode-se verificar que o derivado é capaz de complexar e estabilizar a partícula por apenas 5 minutos nas razões N/P 20 e 50, e para razões menores o potencial aplicado leva a liberação do siRNA nos primeiros minutos de corrida. Após 15 minutos, todo o siRNA é liberado para toda a faixa N/P estudada. Sendo assim, concluiu-se que a interação entre siRNA-SSB e PC₁₈-CH é fraca e esse não é capaz de formar complexos estáveis por muito tempo (Figuras 28 e 29a). O mesmo se verifica para o derivado PC₁₈-CH-PEG-FA na Figura 29b.

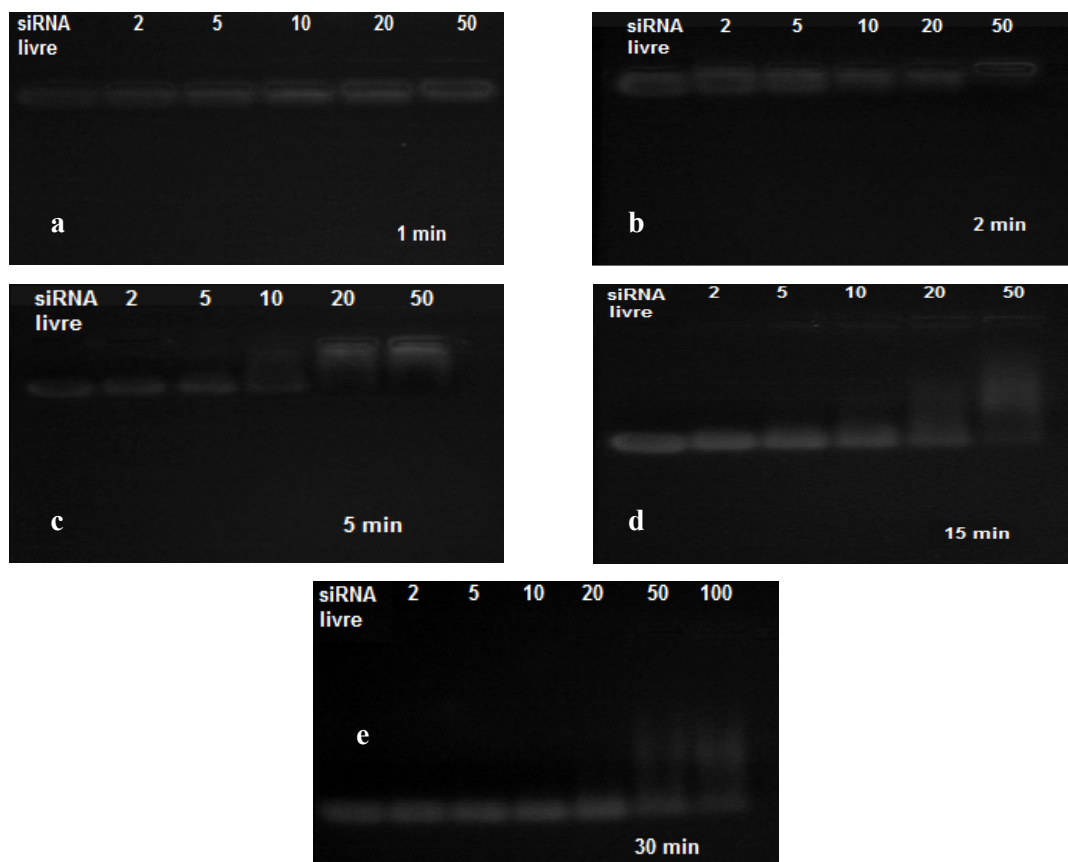


Figura 28. Eletroforese dos políplexos preparados com PC₁₈-CH e siRNA-SSB em pH 6,3 em função do tempo de corrida em minutos (a) 1, (b) 2, (c) 5, (d) 15 e (e) 30.

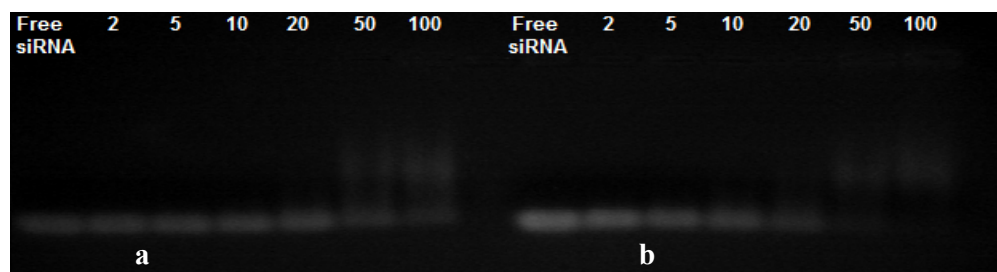


Figura 29. Eletroforese dos políplexos formados com (a) PC₁₈-CH, (b) FA-PEG-CH-PC₁₈ e siRNA-SSB em pH 6,3. Tempo de corrida de 30 minutos. As razões N/P estão indicadas acima de cada poço.

As partículas preparadas com CH-DEAE₁₅ em pH 5,0 e CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4 não liberaram siRNA para N/P de 2 a 100, como mostrado na Figura 30. Em pH 6,3, CH-DEAE₁₅

e DEAE₁₅-CH-PEG-FA também formaram poliplexos estáveis com siRNA-SSB em razões N/P > 2, assim como para o seu controle negativo (Figuras 31 e 32). Diferentemente dos derivados PC₁₈-CH e PC₁₈-CH-PEG-FA, os derivados contendo DEAE foram muito eficientes na interação e estabilidade dos complexos formados com siRNA-SSB, o que se deve à maior massa molecular e ao maior grau de ionização. Quitosanas de baixa massa molecular formam poliplexos menos estáveis com siRNA e acabam não sendo tão eficientes no processo de transfecção, quando comparados com quitosanas de alta massa molecular (FERNANDES et al., 2012). No entanto, massas molares e graus de ionização muito altos formam complexos muito estáveis e dificultam a liberação do pDNA ou siRNA, diminuindo a eficiência de transfecção (LAVERTU et al., 2006).

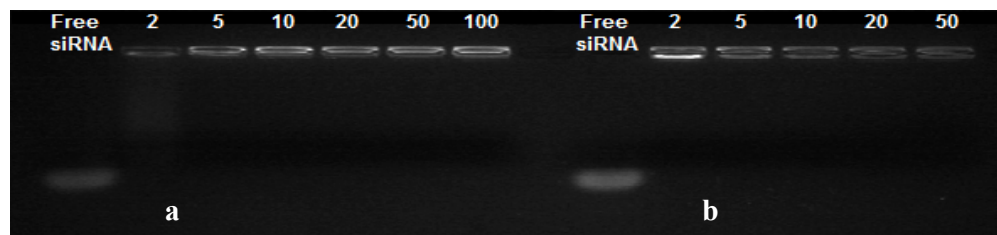


Figura 30. Eletroforese dos poliplexos formados com siRNA-SSB e (a) CH-DEAE15 em pH 5,0 e (b) CH-DEAE100 em pH 7,4 . As razões N/P são indicadas acima de cada poço.

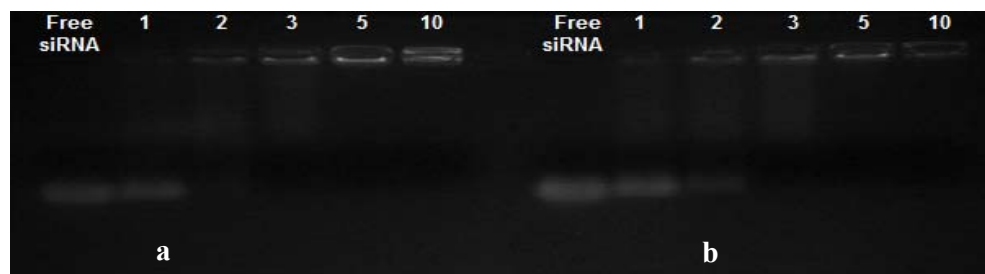


Figura 31. Eletroforese dos poliplexos formados com siRNA-SSB e (a) CH-DEAE₁₅ e (b) siRNA-SSB como controle negativo em pH 6,3. As razões N/P são indicadas acima de cada poço.

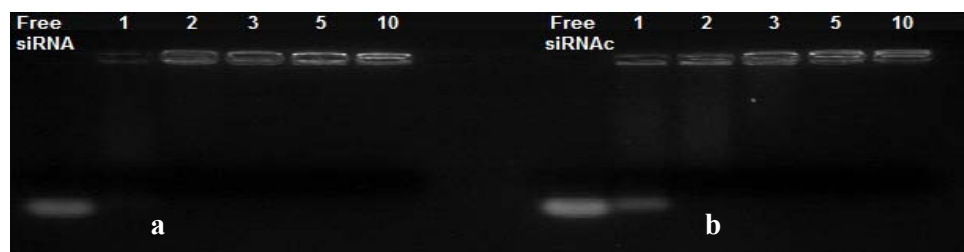


Figura 32. Eletroforese dos poliplexos formados com FA-PEG-CH-DEAE₁₅ e (a) siRNA-SSB e (b) siRNA-SSB controle negativo em pH 6,3. As razões N/P estão descritas acima de cada poço.

3.4. Ensaio de Citotoxicidade

As atividades citotóxicas dos derivados e das NPs foram avaliadas a partir de ensaios de viabilidade celular. As células não tratadas foram utilizadas como controle, ou seja, 100% para o cálculo da viabilidade das células tratadas com derivados ou nanopartículas.

3.4.1. Citotoxicidade da Quitosana e seus Derivados

A citotoxicidade de polímeros catiônicos é dependente de vários fatores, e, de forma geral, moléculas rígidas têm mais dificuldades para se ligar a membranas que as moléculas flexíveis (RYSER, 1967; SINGH; KASINATH; LEWIS, 1992). Portanto, altas densidades de carga positiva e polímeros altamente flexíveis devem causar efeitos citotóxicos mais elevados do que aqueles com baixa densidade de carga positiva. Em geral, macromoléculas com grupos amina terciária exibem uma toxicidade mais baixa do que aqueles com aminas primárias e secundárias, e alguns trabalhos confirmam essa tendência (FERRUTI et al., 1997; FISCHER et al., 2003).

A Figura 33 mostra o efeito da concentração dos derivados na viabilidade celular, em células HeLa, dos polímeros da série I. A viabilidade celular se manteve maior que 80% para a maioria dos derivados até a concentração de 2 mg/mL, com exceção do PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ que, a partir da concentração 0,6 mg/mL, diminuiu a viabilidade para 49% em 2 mg/mL. Nota-se claramente que a citotoxicidade dos polímeros aumenta ligeiramente com as

modificações feitas na quitosana e que, quanto maior o GS_{deae}, menor é a viabilidade celular. No entanto, todos os derivados da série I foram menos citotóxicos que a lipofetamina.

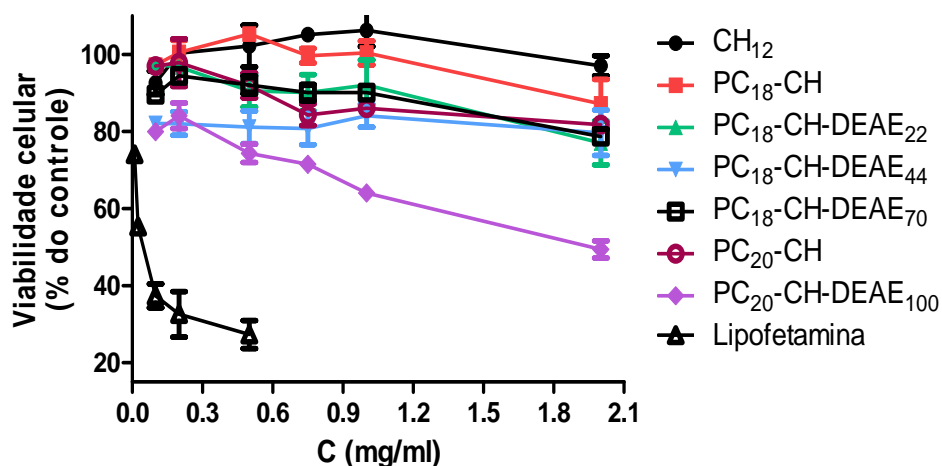


Figura 33. Viabilidade celular de células HeLa em função da concentração dos polímeros da série I e da lipofetamina.

Os polímeros da série II também foram analisados a partir da viabilidade celular de células HeLa em função de suas concentrações (Figura 34). Na presença de quitosana desacetilada, CH₁₇, a viabilidade se mantém em 100% até a concentração 1 mg/ml, atingindo 95% em 1,5 mg/ml. Assim como para os derivados da série I, os derivados contendo DEAE mostraram-se mais citotóxicos do que a quitosana desacetilada. O derivado CH-DEAE₁₅ foi o único derivado que não diminuiu a viabilidade celular abaixo de 80% até a concentração de 1,5 mg/ml. Na concentração de 1,5 mg/ml, os derivados CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ atingiram um mínimo de viabilidade celular de 58, 30 e 20% respectivamente. Assim, verifica-se que o aumento no GS_{deae} aumenta a citotoxicidade dos polímeros. No entanto, todos os polímeros apresentaram citotoxicidade inferior ao lipídeo comercial lipofetamina. Os valores de CI₅₀ (concentração na qual ocorre inibição de 50% da viabilidade celular) são expostos na Tabela 5.

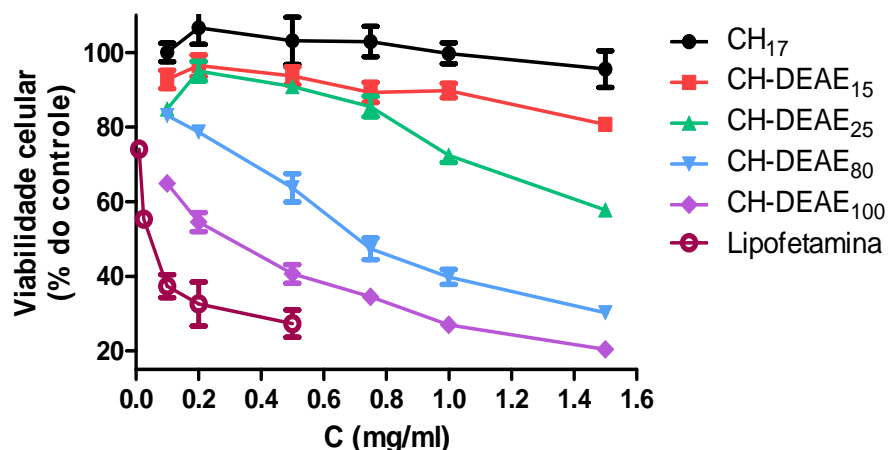


Figura 34. Viabilidade celular de células HeLa em função da concentração dos polímeros da série II e da lipofetamina.

Tabela 6. Valores de CI₅₀ dos polímeros da série I, da série II e do lipídeo comercial lipofetamina em células HeLa.

I	Derivado	CH ₁₂	PC ₁₈ -CH	PC ₁₈ -CH- DEAE ₂₂	PC ₁₈ -CH- DEAE ₄₄	PC ₁₈ -CH- DEAE ₇₀	PC ₂₀ -CH	PC ₂₀ -CH- DEAE ₁₀₀
	CI ₅₀ (mg/mL)	NS	24,9	7,2	4,65	7,9	6,9	1,67
II	Derivado	CH ₁₇	CH- DEAE ₁₅	CH- DEAE ₂₅	CH- DEAE ₈₀	CH- DEAE ₁₀₀	Lipofetamina	
	CI ₅₀ (mg/mL)	233	6,78	2,74	0,72	0,3	0,053	

3.4.2. Citotoxicidade dos Poliplexos Preparados com pDNA VR 1412

A citotoxicidade de quitosana e de suas nanopartículas tem sido indicada como comparável, originando valores de CI₅₀ similares, entretanto são atenuadas pela diminuição do grau de desacetilação, mas são pouco afetadas pela redução na Mw (HUANG et al., 2004).

A formação das nanopartículas neutraliza cargas positivas dos polícatíons e, em baixas razões N/P, são esperadas viabilidades celulares maiores.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para a avaliação da citotoxicidade em função da razão N/P de poliplexos formados com pDNA (Figuras 35, 36 e 37) e com siRNA-SSB (Figuras 38, 39 e 40) e os polímeros das séries I e II. A viabilidade de HeLa na presença dos poliplexos formados com a série I permaneceu acima de 80% para $N/P < 6$, havendo um ligeiro decaimento para $\sim 75\%$ para razões maiores, com exceção do derivado PC-CH-DEAE₇₀ que manteve a viabilidade celular acima de 80% para todas as razões N/P (Figura 35). Para o derivado PC₂₀-CH, a viabilidade celular permaneceu acima de 90% para quase todas as razões N/P. Já para o PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, somente na razão 10 N/P a viabilidade caiu para $\sim 60\%$ (Figura 36). Para os poliplexos preparados com os derivados da série II, a viabilidade celular em pH 7,4 se manteve acima de 80% em todas as razões N/P estudadas, com exceção das razões N/P 5 e 10 para o derivado CH-DEAE₁₀₀ que atingiu 73% e 58% de viabilidade celular respectivamente (Figura 37). Por outro lado, como demonstrado anteriormente em pH 5,0, a viabilidade celular decai 30-20% para os polímeros com maior GSdeae (CH-DEAE₁₀₀, CH-DEAE₈₀), o que se deve à maior densidade de cargas positivas, pois nesse pH quase todos os grupos amina encontram-se protonados (grau de ionização $\alpha \approx 1,0$) (OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013). A análise estatística foi realizada por meio de teste “t”.

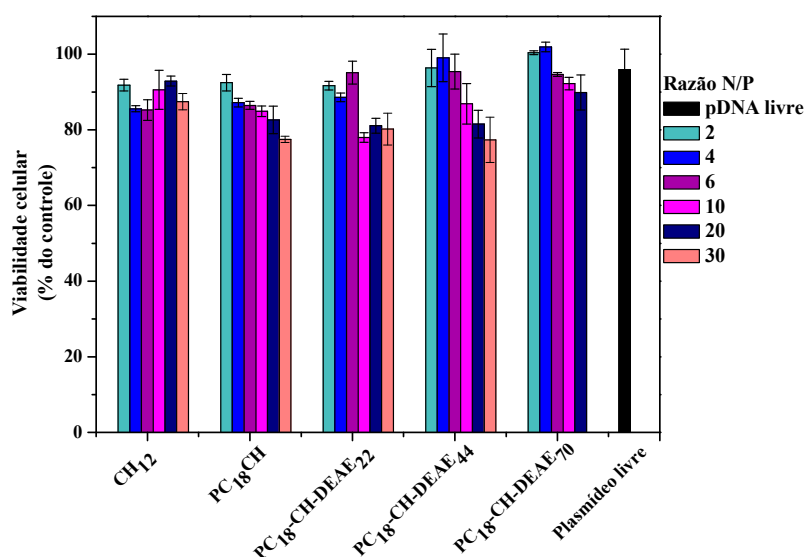


Figura 35. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros da série I em pH 6,3.

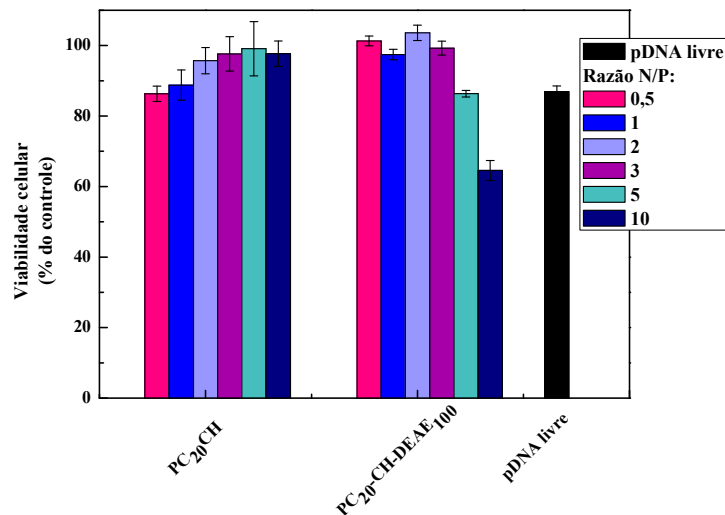


Figura 36. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4.

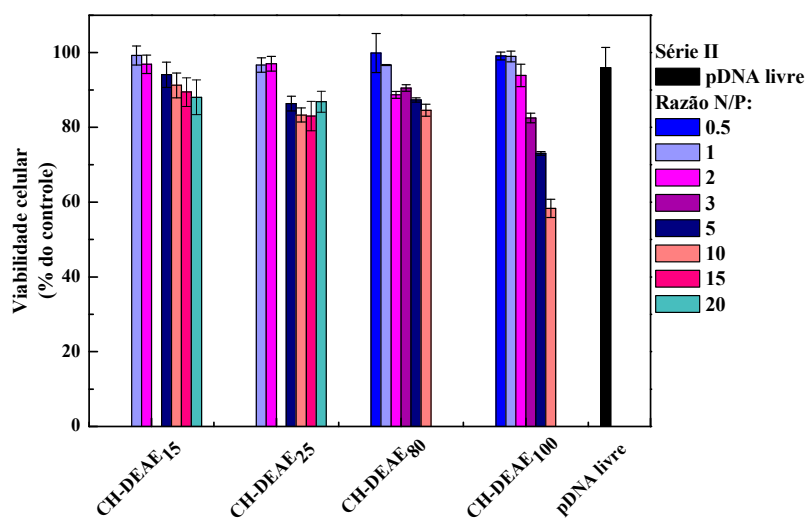


Figura 37. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de pDNA com os polímeros da série II em pH 7,4.

3.4.3. Citotoxicidade dos Poliplexos Preparados com o RNA de interferência (siRNA-SSB).

A citotoxicidade dos poliplexos de siRNA-SSB, em pH 6,3, também foi analisada por meio de experimentos de viabilidade celular de células HeLa em função de N/P. Partículas preparadas com PC₁₈-CH demonstraram baixa citotoxicidade para N/P até 50, atingindo 74% de viabilidade celular. Para N/P = 100 e 160, houve morte celular de aproximadamente 50% das células (Figura 38). As Figuras 39 e 40 mostram a viabilidade celular dos poliplexos formados respectivamente, com CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA. Essas partículas não se mostraram fortemente citotóxicas para razões N/P até 10, atingindo um mínimo de viabilidade de 77%. Verifica-se que a substituição com PEG-FA no polímero CH-DEAE₁₅ não influenciou na viabilidade celular das células HeLa nas razões N/P avaliadas (Figura 39 e 40).

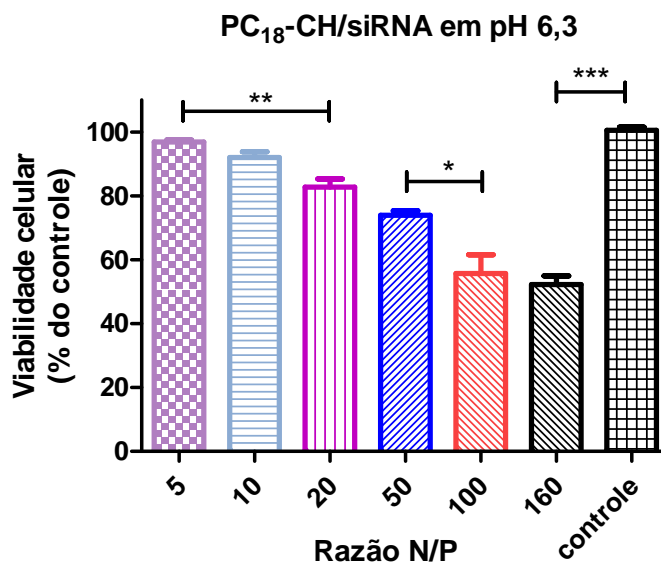


Figura 38. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de poliplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero PC₁₈-CH em pH 6,3. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005.

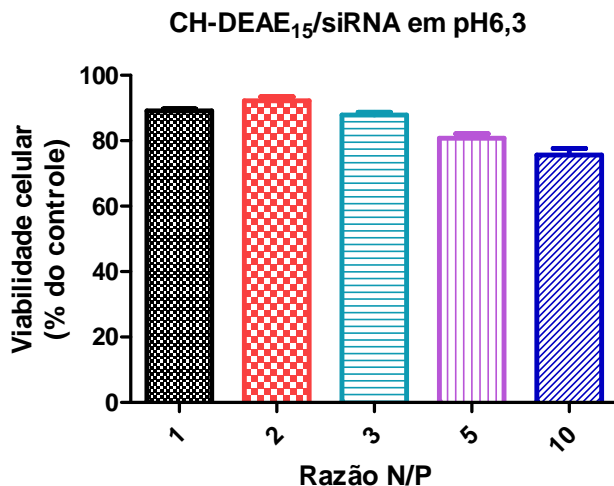


Figura 39. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de políplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero CH-DEAE₁₅ em pH 6,3.

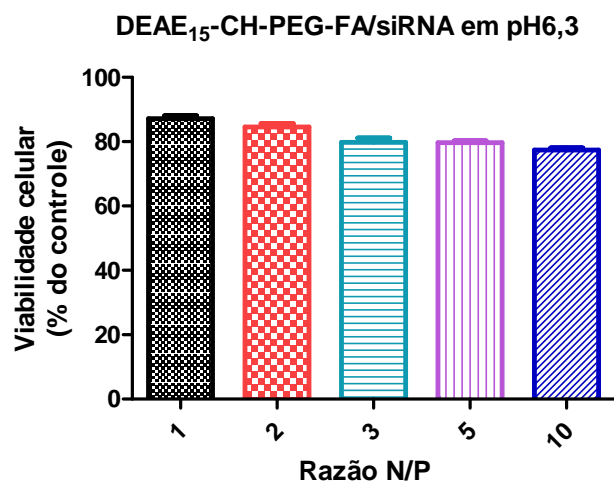


Figura 40. Viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de políplexos preparados de siRNA-SSB com o polímero DEAE₁₅-CH-PEG-FA em pH 6,3.

Os resultados de toxicidade em função da concentração de polímeros ou da razão N/P de políplexos estão de acordo com os encontrados na literatura. A toxicidade se mostra fortemente correlacionada com o potencial zeta dos políplexos e do grau de ionização dos

polications, sendo os polications livres mais tóxicos que os poliplexos, assim como observado por Nimesh e colaboradores (NIMESH et al., 2010). Para nanopartículas preparadas com siRNA, observou-se concordância nos resultados obtidos com o derivado PC₁₈-CH e quitosanas utilizadas na literatura, devido à alta razão N/P utilizada (FERNANDES et al., 2012; LIU, X. et al., 2007). No entanto, quitosana modificada com DEAE, CH-DEAE₁₅, mostrou-se menos citotóxica do que a quitosana não modificada (FERNANDES et al., 2012; LIU, X. et al., 2007), devido à menor razão N/P necessária para a formação de partículas estáveis com os derivados preparados no presente trabalho.

3.5. Eficiência de transfecção

Os poliplexos preparados com o plasmídeo VR1412 e os polímeros das séries I e II foram utilizados para testes de transfecção *in vitro* em células HeLa e a eficiência de transfecção foi avaliada em função da razão N/P, por meio de ensaios ELISA para a proteína β -gal e ensaio de BCA para proteínas totais (Figuras 41, 42 e 43). A eficiência das NPs foi comparada com a eficiência do lipídeo comercial lipofetamina (2220 pg de proteína β -gal/mg de proteínas totais). Os derivados que proporcionaram melhor eficiência de transfecção com pDNA foram selecionados para a preparação das nanopartículas com o siRNA-SSB. A eficiência no bloqueio da expressão do RNAm SSB foi verificada em função da razão N/P *in vitro* em células HeLa, por meio de RT-PCR em tempo real (Figuras 44 e 45). Novamente, o lipídeo comercial lipofetamina foi utilizado como controle positivo no bloqueio do RNAm SSB, obtendo 88% de inibição. O controle negativo do siRNA-SSB também foi testado com os polímeros selecionados e não houve bloqueio na expressão do RNAm para nenhum dos derivados.

3.5.1. Plasmídeo VR1412 (β -gal)

A eficiência de transfecção foi avaliada para os derivados da série I, nos pHs 6,3 e 7,4, a partir da expressão da proteína β -gal (Figuras 42 e 43). A expressão da proteína mostrou-se dependente da razão N/P e do pH de preparação dos poliplexos. Em pH 6,3, CH₁₂ expressou β -gal somente para N/P = 10 e 20, sendo que a eficiência foi vinte vezes maior

para N/P 10. O decréscimo na eficiência em N/P 20 pode ser atribuído ao excesso de quitosana. Estudos recentes mostraram que o excesso de quitosana é fundamental para aumentar a eficiência de transfecção (THIBAUT et al., 2011), e que a liberação de genes é controlada pela força de ligação entre quitosana e pDNA (STRAND et al., 2010). Portanto, para N/P 20, a expressão do transgene diminuiu, indicando que os poliplexos são excessivamente estáveis (STRAND et al., 2010). Mesmo na razão N/P 10, a eficiência de transfecção da CH₁₂ é 5 vezes menor do que a mediada pela lipofetamina. Para N/P < 10, a transfecção é desprezível, e pode, em parte, ser explicada considerando os valores de potencial zeta, que são muito baixos ou negativos, diminuindo assim a captação celular (HUANG et al., 2005).

A expressão do gene depende fortemente da estrutura dos polímeros. As nanopartículas preparadas com PC₁₈-CH, aumentaram consideravelmente (100 x) a partir de N/P 4 a 10, sendo 16 vezes mais eficiente relativo a N/P = 4, e diminuiu novamente em N/P 20. Esse resultado se relaciona bem com o ensaio de retardamento em gel de agarose e as medições dos potenciais zeta. Tal como mostrado na Figura 41, a eficiência de transfecção de NPs preparadas com PC₁₈-CH atingiu o máximo na N/P 10, quando o potencial zeta atingiu um valor positivo de +15 mV (Figura 17a). Acima de N/P 10, o potencial zeta mantém-se constante o que pode indicar que o excesso de polímero pode estar livre em solução ou fracamente associado à nanopartícula, o que pode dificultar a liberação do pDNA. Além disso, o pDNA foi completamente retido no ensaio de eletroforese, como pode ser visto a partir da Figura 20a na razão N/P 10. Esse resultado indica que, embora a interação com as células possa ser favorecida na presença de um excesso de polímero, a liberação de pDNA dentro do citoplasma é diminuída. Observa-se que a eficiência de transfecção do PC₁₈-CH foi 4 vezes maior do que a CH₁₂, na razão 10 N/P, e próxima daquela exibida pela lipofetamina. Isso mostra que o conteúdo de PC na quitosana auxilia no processo de transfecção e aumenta a expressão de β-gal. Esse aumento pode ser atribuído à mudança no pKa do grupo amina, que se traduz numa maior capacidade tamponante. Entretanto, a presença do grupo PC confere maior hidrofobicidade às partículas, diminuindo a agregação entre elas. Além disso, em pH 6,3, as partículas obtidas com PC₁₈-CH na razão N/P 10 apresentam maior valor de potencial zeta e menor Dh do que a quitosana desacetilada CH₁₂ (Figura 16a e 17a).

Os derivados modificados com DEAE, PC₁₈-CH-DEAE₂₂ e PC₁₈-CH-DEAE₄₄, não foram mais eficientes na expressão de β-gal em comparação a CH₁₂ em pH 6,3 (Figura 41).

Embora inesperado, os resultados podem ser interpretados considerando que a presença de grupos amina terciária aumenta o grau de ionização do polícatión e, portanto, aumenta a força de ligação entre pDNA e os derivados contendo DEAE.

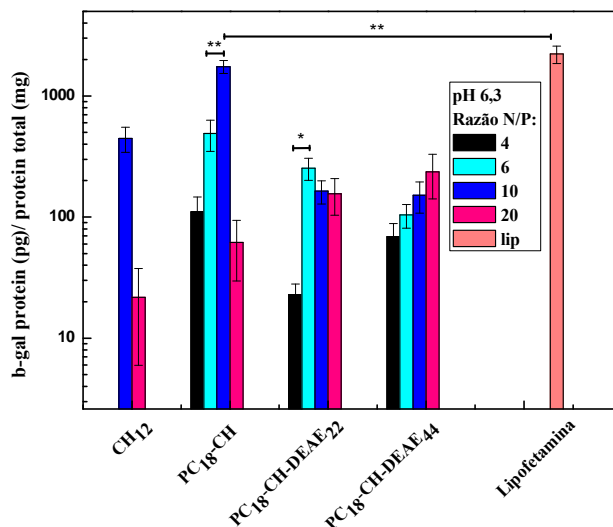


Figura 41. Eficiência de transfecção dos políplexos preparados com CH₁₂, PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₂₂ e PC₁₈-CH-DEAE₄₄ em pH 6,3. Valores de expressão de β-gal/proteína total. * p<0,05 e ** p<0,01.

Em geral, a captação celular é mais eficiente quando o pH é inferior a 7,0 e os complexos são carregados positivamente com tamanhos inferiores a 1 μm (NIMESH et al., 2010). Uma superfície positivamente carregada é particularmente importante para promover uma captação celular eficiente, bem como para manter a estabilidade das NPs. O pH pode ter um grande impacto na eficácia da transferência de genes por quitosana e, como o grau de ionização (α) de quitosana é dependente do pH, tem-se mostrado que a expressão mediada por oligômeros de quitosana, diminuiu drasticamente para pH > 7,2 (STRAND et al., 2008).

Em pH 7,4, somente as quitosanas PC₂₀-CH, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀ da série I foram capazes de expressar a proteína β-gal (Figura 42). No entanto, apenas o derivado contendo alto GSdeae, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, foi mais eficiente, apresentando uma expressão 24 vezes maior que PC₂₀-CH. Nesse pH, verificou-se que esses polímeros formaram partículas com o pDNA nos experimentos de espalhamento de luz, mas o tamanho desses não foi estável em função do tempo, com exceção do polímero PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, que manteve um tamanho de 190 nm (Figura 19a). A agregação de partículas pode dificultar a liberação do pDNA, afetando a transfecção e diminuindo a expressão da proteína. Além

disso, o grau de ionização de polímeros contendo DEAE é alto, $\sim 0,7$, o que aumenta o potencial zeta dos políplexos e pode auxiliar no processo de transfecção. Portanto, os resultados mostram que se pode aumentar significativamente a eficiência de transfecção da quitosana em pH 7,4, com substituições por grupos PC e DEAE, sendo que o derivado com maior Mw e maior GSdeae foi o mais efetivo.

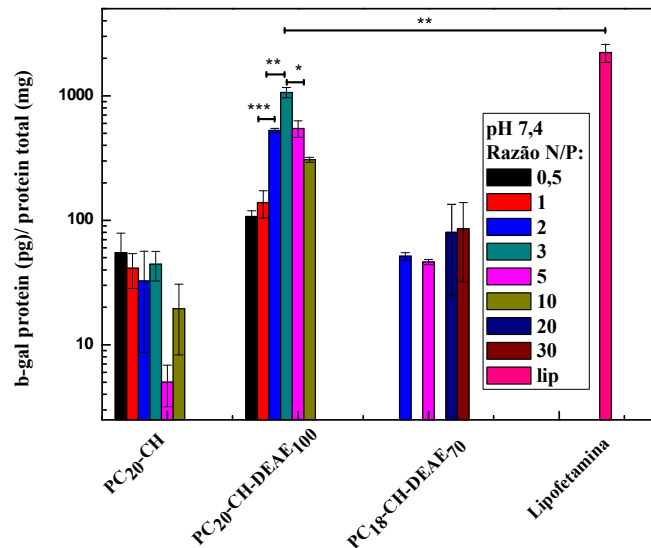


Figura 42. Eficiência de transfecção dos políplexos preparados com PC₂₀-CH, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀ em pH 7,4. Valores de expressão de β -gal/proteína total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Os derivados da série II foram utilizados para o preparo de políplexos com pDNA nas razões N/P 0,5 a 10, em pH 5,0 e 7,4 e sua eficiência de transfecção foi analisada novamente em função da expressão da proteína β -gal (Figuras 43a e 43b). A transfecção utilizando a série II foi realizada com o objectivo de avaliar o efeito dos grupos DEAE sobre a eficiência da transfecção. Para essa série, os crescentes graus de substituição por DEAE conferiram aos derivados maiores graus de ionização em pH fisiológico, bem como maiores capacidades de tamponamento. Esses parâmetros podem afetar a interação das nanopartículas com a superfície das células e a captação e entrega do pDNA no citoplasma. A expressão do gene mostrou-se muito dependente da estrutura dos polímeros e do pH do meio. As NPs preparadas com CH exibiram um comportamento similar às NPs de quitosana de menor massa molar (CH12). Em pH 5,0, verificou-se que a eficiência aumenta consideravelmente

(100 x) a partir de N/P 1,0, atingindo o máximo em N/P 2-3, e diminuiu novamente para N/P maiores (OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013). Como discutido anteriormente, os resultados relacionam-se bem com os valores de potencial zeta, e as maiores eficiências foram obtidas para as NPs que apresentaram potenciais ligeiramente positivos (+ 4 mV). Verificou-se também que os resultados tem boa correlação com os experimentos de eletroforese onde, para N/P 2,0, o pDNA foi completamente retido no ensaio de eletroforese. Por outro lado, as NPs preparadas com os derivados mais substituídos, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀, exibiram eficiências de transfecção inferiores aos obtidos com a CH-DEAE₁₅ e CH-DEAE₂₅ e foram semelhantes àquelas obtidas com a quitosana desacetilada (CH₁₇). Esses resultados podem ser explicados comparando-se os graus de ionização (α), as forças da interação e as citotoxicidades dos derivados. Pode-se atribuir os decréscimos nas eficiências de transfecção por CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ à elevada força de interação desses com o pDNA, bem como as menores capacidades de tamponamento. Portanto, em pH 5,0 o derivado mais eficiente foi o CH-DEAE₁₅ de menor GS e que atingiu 75% da eficiência do lipídeo comercial lipofetamina e aumentou em oito vezes a eficiência de quitosana desacetilada CH₁₇.

Em pH 7,4, parte dos grupos amina dos derivados são desprotonados e a densidade de cargas dos polímeros, bem como o potencial zeta e estabilidade das NPs, diminui. Nesse pH, somente os poliplexos preparados com os derivados CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ foram eficientes no processo de transfecção. Para o derivado CH-DEAE₂₅, apenas na razão 2 N/P foi observado expressão da proteína. Para as NPs preparadas com os derivados mais substituídos, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀, maiores eficiências de expressão foram obtidas para todas as razões N/P e os maiores valores foram obtidos nas razões N/P 2 e 3. A comparação entre os três derivados mostra que os CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ aumentaram em 15 vezes, a eficiência das NPs obtidas com CH-DEAE₂₅. Comparando-se as eficiências de transfecção entre os polímeros CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀, observa-se que a expressão de β -gal foi 2 vezes maior para o derivado com maior GS e muito próximo daquela exibida por lipofectamina. Assim como para os polímeros da série I, os derivados contendo alto GS deac são mais efetivos na transfecção de pDNA em pH 7,4. A maior eficiência pode ser atribuída ao maior grau de ionização desses polímeros, maior potencial zeta das partículas e à maior estabilidade das NPs em função do tempo, como verificado na Figura 19b.

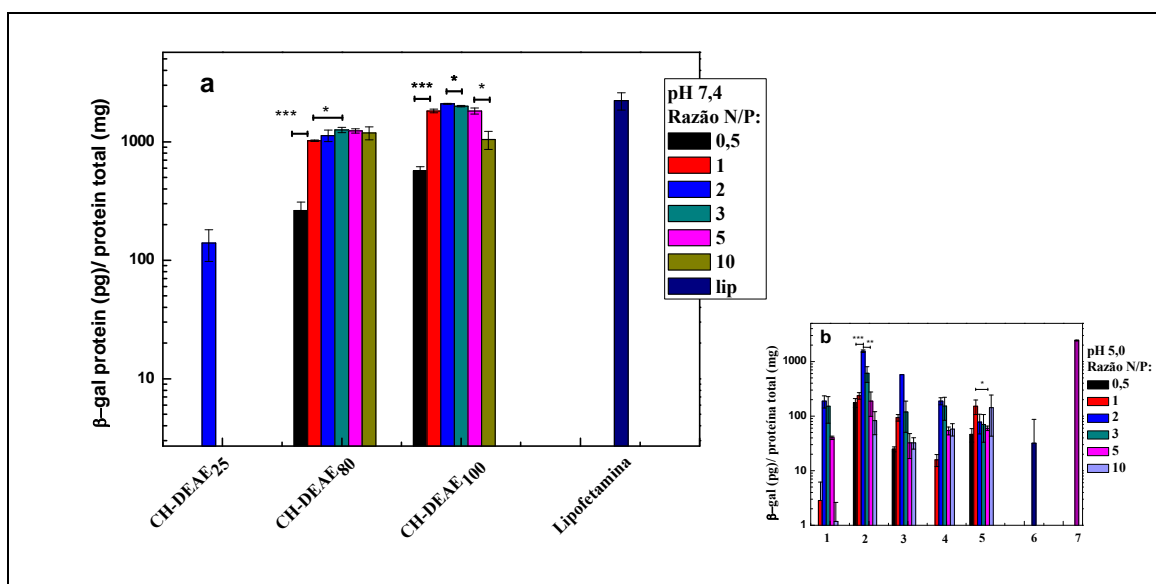


Figura 43. a) Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com CH-DEAE₂₅, CH-DEAE₈₀ e CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4. b) Eficiência de transfecção dos poliplexos preparados com CH₁₇ (1), CH-DEAE₁₅ (2), CH-DEAE₂₅ (3), CH-DEAE₈₀ (4) e CH-DEAE₁₀₀ (5) em pH 5,0 e pDNA livre (6) e lipofectamina (7). (Adaptado de (OLIVEIRA, F. D. P. P., 2011; OLIVEIRA, F. P. P. et al., 2013)). Valores de expressão de β-gal/proteína total. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005.

Os resultados desse trabalho, quando comparados com a literatura, mostram que de fato a eficiência da transfecção *in vitro* pode ser afetada por vários fatores, como o potencial zeta das partículas, razão N/P, o pH do meio, a massa molar e a capacidade de tamponamento do polímero (HUANG et al., 2005; KOPING-HOGGARD et al., 2001; LAVERTU et al., 2006; SATO et al., 2001). Entretanto, esses derivados mostraram-se promissores e, em princípio, podem ser otimizados pelo aumento da capacidade tamponante, ajuste da massa molar e do grau de ionização no pH fisiológico, de forma a aumentar ainda mais a expressão do gene *in vitro*.

Portanto, na série I, o polímero que mediou a transfecção mais eficiente foi o CHPC₁₈, que em pH 6,3 formou partículas estáveis com tamanhos em torno de 150 nm na razão N/P 10 e potencial zeta de +16 mV. Na série II e em pH 5,0, o polímero mais eficiente foi o menos substituído com DEAE, CH-DEAE₁₅, que formou partículas estáveis na razão N/P 2 com 160 nm de tamanho e +18 mV de potencial zeta. O excesso do polímero e a maior capacidade de tamponamento são parâmetros que podem ter aumentado o escape endossomal (HUANG et al., 2005; KOPING-HOGGARD et al., 2001; THIBAUT et al., 2011). Os

outros polímeros contendo DEAE em pH 6,3, não mediaram expressão gênica eficiente devido ao alto grau de ionização, o que aumenta a força de interação com o pDNA e impede sua liberação para expressão (STRAND et al., 2010).

Em pH 7,4, os polímeros mais efetivos foram os derivados mais substituídos com DEAE, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ e CH-DEAE₁₀₀, que formaram partículas estáveis, de tamanho em torno de 150 nm na razão N/P 3, com potencial zeta acima de +10 mV, sendo os únicos derivados que formaram partículas com potencial zeta positivo acima de +10 mV nesse pH. Os resultados comprovam que embora o potencial zeta seja um fator importante para promover a estabilidade das partículas, a captação celular e a eficiência de transfecção, o aumento desse parâmetro por si não resulta num aumento na eficiência. Os derivados mais substituídos não se mostraram degradáveis pelas enzimas lisozima e quitosanase e modificações regioseletivas sobre os grupos hidroxila podem ser uma alternativa para manter a biodegradabilidade.

3.5.2. Eficiência do Processo de Supressão pelo RNA de interferência (siRNA-SSB)

Os obstáculos para liberação segura e específica de siRNAs são, em muitos aspectos, semelhantes aos enfrentados para o transporte e liberação de plasmídeos (SCHOLZ; WAGNER, 2012). No entanto, as mais proeminentes diferenças entre a liberação de pDNA e terapias com o siRNA são o local de ação no qual as moléculas terapêuticas exercem a sua função, isto é, enquanto pDNA é obrigado a entrar no núcleo da célula para promover a expressão do gene desejado, o siRNA, uma vez entregue no citoplasma, tem de ser capaz de se associar ao complexo de indução de silenciamento do RNA (RISC) e reconhecer o mRNA, bloqueando a produção de proteínas específicas. Entretanto, devido às características estruturais dos siRNAs, a etapa inicial na produção das nanopartículas pode apresentar complicações adicionais. Em contraste com o pDNA, cujo tamanho pode atingir vários pares de bases, os siRNAs são estruturalmente formados por 21-25 pares de bases de fragmentos curtos e são mais rígidos e, conseqüentemente, eles interagem de forma mais fraca com as cadeias dos polímeros e podem não ser completamente envolvidos por elas (FERNANDES et al., 2012).

Com isso, os polímeros que se mostraram mais eficientes na transfecção com o plasmídeo VR1412 foram selecionados e modificados com o ligante FA para o estudo com siRNA em células HeLa. Os selecionados, PC₁₈-CH, CH-DEAE₁₅ e CH-DEAE₁₀₀, foram utilizados para o preparo de poliplexos com siRNA nos mesmos pHs em que apresentaram a melhor eficiência com o plasmídeo, pH 6,3 para o PC₁₈-CH e o CH-DEAE₁₅ e pH 7,4 para o CH-DEAE₁₀₀. Todos esses polímeros foram modificados com o ligante PEG-FA, com exceção do derivado CH-DEAE₁₀₀. O único polímero que não mostrou eficiência no bloqueio do RNAm SSB foi o CH-DEAE₁₀₀ em pH 7,4. A interação eletrostática forte, devido ao conteúdo de aminas quaternárias e alto grau de ionização desse derivado em pH 7,4, pode ter impedido a liberação do siRNA-SSB (LAVERTU et al., 2006).

O derivado PC₁₈-CH foi efetivo na transfecção de siRNA-SSB, obtendo-se bloqueios na expressão do mRNA SSB, chegando a 43% para N/P 10 e 64% para as razões N/P 20 e 50 (Figura 44a), valores estatisticamente significativos, $p < 0,01$ e $p < 0,005$. Para baixa razão N/P 5, a expressão do RNAm foi a mesma observada nas células tratadas com siRNA livre. O derivado contendo PEG-FA, PC₁₈-CH-PEG-FA, bloqueou 50% da expressão de mRNA na razão N/P 10, $p < 0,01$, e 69% na razão N/P 20. No entanto, na razão N/P 50, não foi obtido um decréscimo significativo na expressão do mRNA SSB (Figura 44b).

Para os poliplexos formados com os derivados CH-DEAE₁₅ e DEAE₁₅-CH-PEG-FA, houve bloqueio significativo na expressão do mRNA SSB em todas as razões estudadas, 1 à 5 N/P. Além disso, não houve variação significativa entre os valores de expressão observados com o derivado contendo ou não PEG-FA (Figuras 45a e 45b). Os bloqueios na expressão do mRNA SSB observados foram de 80% para razão N/P 1 e 2, 72% para razão N/P 3 e 75% em N/P 5. As baixas razões N/P foram mais efetivas chegando próximo ao valor de bloqueio observado para o lipídeo comercial lipofetamina, cuja eficiência para o bloqueio foi de 88%. Esses resultados mostram que o derivado CH-DEAE₁₅, com ou sem folato, é mais eficiente no bloqueio de mRNA que outras quitosanas utilizadas na literatura. Quitosanas de 25 e 50 kDa, também contendo ou não folato, utilizadas por Fernandes e colaboradores, obtiveram 60% de bloqueio (FERNANDES et al., 2012). Liu et al. também conseguiram 80% de bloqueio de mRNA utilizando quitosanas de massas molares de 114 e 170 kDa, mas utilizaram razão de N/P 150, 30 vezes maior que a utilizada no presente trabalho (LIU, X. et al., 2007).

Portanto, podemos concluir que, comparando-se com a quitosana não modificada, além de oferecer proteção aos ácidos nucleicos, os polímeros obtidos melhoraram a captação celular e a liberação do siRNA das NPs, duas propriedades importantes para entrega eficiente *in vivo*. Essas abordagens envolveram a modificação estrutural da quitosana pela inserção de grupos químicos que respondem às condições fisiológicas da via intracelular e acreditamos que podem ser otimizadas para permitir obter um carreador ainda mais eficiente para estudos *in vivo*.

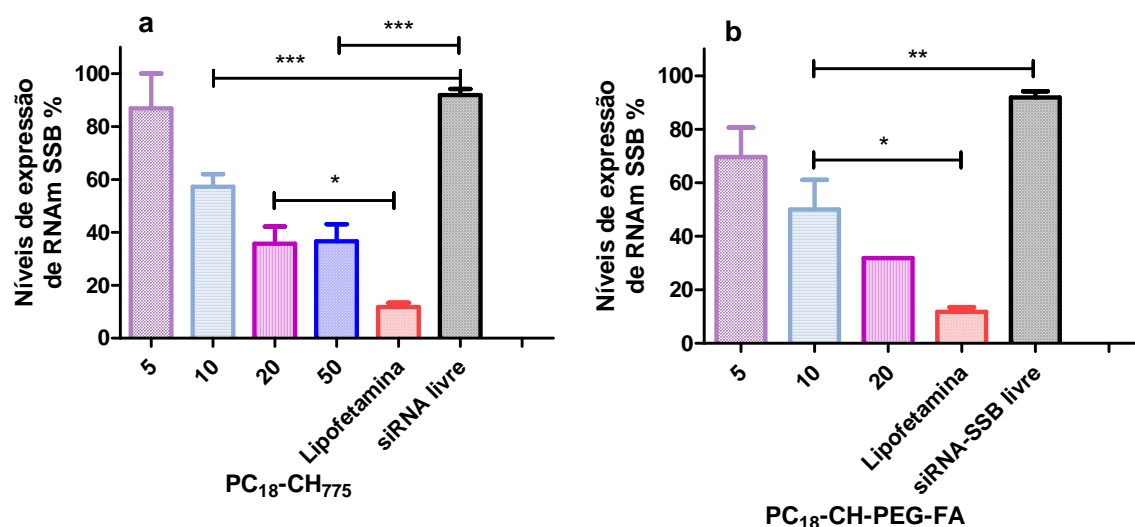


Figura 44. Eficiência de transfecção *in vitro*. 5 µg de siRNA-SSB livre e complexos de PC₁₈-CH/siRNA (a), PC₁₈-CH-PEG-FA/siRNA (b) e lipofetamina/siRNA contendo o equivalente a 5 µg de siRNA-SSB incubados com células HeLa. A expressão do gene SSB é medida por meio de RT-PCR em tempo real e comparada às células não tratadas, considerada como 100%. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005.

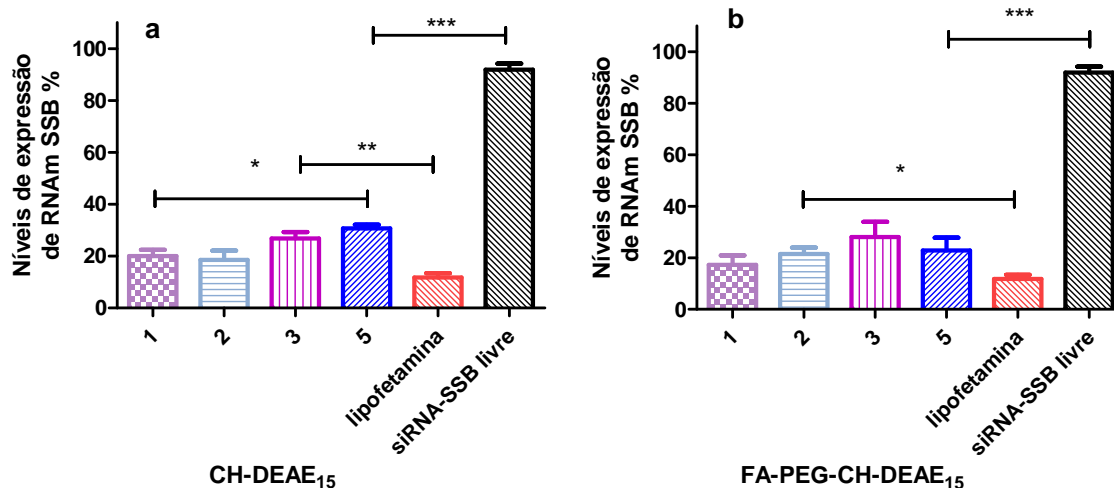


Figura 45. Eficiência de transfecção in vitro. 5 µg de siRNA-SSB livre e complexos de CH-DEAE₁₅/siRNA (a) e DEAE₁₅-CH-PEG-FA/siRNA (b) e lipofetamina/siRNA contendo o equivalente a 5 µg de siRNA-SSB incubados com células HeLa. A expressão do gene SSB é medida por meio de RT-PCR em tempo real e comparada às células não tratadas, considerada como 100%. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005.

Capítulo 4

Conclusões

Nesse trabalho, foram preparados derivados de quitosana substituídos com grupos fosforilcolina e dietilaminoetila para a transferência gênica. O processo de síntese permitiu variar de forma controlada o grau de substituição e a maioria dos polímeros preparados foram eficazes na formação de nanopartículas com pDNA ou siRNA nos pHs estudados. O tamanho das partículas obtidas variou de 100 a 700 nm e os potenciais zeta de +5 a +22 mV. Os estudos conduzidos para avaliação do tamanho e estabilidade das partículas mostraram que o pH tem um papel importante na estabilidade dessas partículas. Na preparação das nanopartículas em baixo pH, 5,0 e 6,3, a protonação dos grupos amino dos derivados aumenta a força de interação, a estabilidade e o potencial zeta das NPs. Entretanto, a transfecção pode ser afetada de forma negativa, dificultando a liberação intracelular do pDNA. O aumento do potencial zeta não afeta significativamente a eficiência da transfecção, e valores positivos da ordem de +5 a +10 mV são suficientes para promover uma captação eficiente. Os resultados mostraram ainda que a eficiência pode ser fortalecida pelo aumento da capacidade de tamponamento dos derivados, que é determinante para o sucesso da liberação intracelular.

Os estudos de transfecção realizados com as partículas preparadas em pH 7,4 confirmaram que o controle da interação polycation-DNA é outro parâmetro determinante para liberação e transfecção eficientes. Nesse pH, os polímeros apresentam graus de ionização variáveis e suas composições podem ser controladas para obtenção de partículas estáveis em pH fisiológico. Os derivados mais substituídos, com graus de substituição de 80% e 100%, apresentaram eficiência de transfecção similar a do lipídeo comercial lipofectamina. O controle da razão de grupos amina do polycation e de grupos fosfato do pDNA ou siRNA (N/P) utilizado na preparação das NPs controla tanto a captação celular quanto a liberação e a eficiência do processo de transfecção/liberação. De forma geral, a preparação de nanopartículas com os polímeros mais substituídos requer, em pH fisiológico, menor razão N/P para maximizar a eficiência. Ademais, os poliplexos mostraram proteger o pDNA contra degradação por DNase I e a integridade do pDNA foi comprovada após digestão dos polímeros com lisozima e quitosanase. No entanto, a degradabilidade dos

polímeros contendo alto GSdeae foi prejudicada, possivelmente devido à modificação do sítio de ligação (grupos amino da quitosana), que não pode ser reconhecido pelo sítio ativo das enzimas mencionadas.

Um fator importante no preparo de vetores não virais é a citotoxicidade. Os estudos mostraram que o aumento do grau de substituição por DEAE aumenta a citotoxicidade, mas que pode ser controlada, sendo ainda muito inferior à exibida pelo lipídeo comercial lipofetamina2000. Os ensaios de transfecção demonstraram que a eficiência é fortemente dependente da massa molecular do polímero e que o GSdeae pode ser controlado para promover uma liberação eficiente do siRNA. Além disso, pode-se inferir que a interação entre os derivados de quitosana e siRNA viabiliza a otimização para atingir uma alta eficiência no processo de silenciamento.

Das séries sintetizadas, quatro derivados CH-PC₁₈, PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀, CH-DEAE₁₅, CH-DEAE₁₀₀ apresentaram eficiências comparáveis ao lipídeo comercial lipofectamina, com citotoxicidade muito mais baixa. Portanto, a otimização das características do polímero, massa molecular, grau de substituição, bem como a introdução de ligações bioreduzíveis, podem aumentar ainda mais a eficiência destes tipos de derivados.

Referências

ANTHONSEN, M. W.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 3, p. 193-201, 1993.

ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, // 2009.

BADAWY, M. E.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, 2011.

BAGHERI-KHOULENJANI, S.; TAGHIZADEH, S. M.; MIRZADEH, H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 773-778, 11/17/ 2009.

BATISTA, I.; ROBERTS, G. A. F. A novel, facile technique for deacetylating chitin. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 191, n. 2, p. 429-434, 1990.

BEHR, J.-P. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 51, n. 1-2, p. 34-36, // 1997.

BING WANG, J. Z., SHAOHUI CUI, BAOLING YANG, YINAN ZHAO, BUDIAO ZHAO, YAN DUAN AND SHUBIAO ZHANG. Cationic liposomes as carriers for gene delivery: Physico-chemical characterization and mechanism of cell transfection. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2763-2773, 07/02/2012 2012.

BOUSSIF, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7297-301, Aug 1 1995.

BROWN, T. A. **Gene cloning and DNA analysis : an introduction**. 6th. Oxford ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. xvi, 320 p. ISBN 978140518173014051817379781444334074 (hbk.)1444334077 (hbk.).

CASE, A. H. et al. Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans. **J Colloid Interface Sci**, v. 336, n. 1, p. 125-33, Aug 1 2009.

CENTELLES, M. N. et al. New methodologies to characterize the effectiveness of the gene transfer mediated by DNA-chitosan nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 451-60, 2008.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 261-8, Feb 2001.

CHEVRE, R. et al. Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 4, p. 1610-22, Mar 2011.

CHOI, J. W. P. K.-H. Acid-base Equilibria and Related Properties of chitosan. **Bulletin of Korean Chemical Society**, v. 4, n. 2, p. 68-72, 1983.

CHUL CHO, K. et al. Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis. **J Control Release**, v. 108, n. 1, p. 121-31, Nov 2 2005.

CORSI, K. et al. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1255-64, Mar 2003.

CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. DETERMINATION OF DEGREE OF DEACETYLATION OF CHITOSAN-COMPARISON OF METHODS. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...** v. XVII, 2012.

DA MOTA, L. M. et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 3, p. 199-219, May-Jun 2011.

DE CARVALHO CANELLA, K. M. N.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel–influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

DESIGAUX, L. et al. Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 42, p. 16534-9, Oct 16 2007.

DONATI, I. et al. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. **Biomaterials**, v. 26, n. 9, p. 987-98, Mar 2005.

DOUGLAS, K. L.; PICCIRILLO, C. A.; TABRIZIAN, M. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. **J Control Release**, v. 115, n. 3, p. 354-61, Oct 27 2006.

EAST, L.; ISACKE, C. M. The mannose receptor family. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 364-86, Sep 19 2002.

ELOUAHABI, A.; RUYSSCHAERT, J. M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. **Mol Ther**, v. 11, n. 3, p. 336-47, Mar 2005.

ENGERING, A. J. et al. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 9, p. 2417-25, Sep 1997.

ERBACHER, P. et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. **Pharm Res**, v. 15, n. 9, p. 1332-9, Sep 1998.

FEI LIU, X. et al. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324-1335, 2001.

FELGNER, P. L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 21, p. 7413-7, Nov 1987.

FERNANDES, J. C. et al. Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5833-45, 2012.

FERNANDES, J. C. et al. Bone-protective effects of nonviral gene therapy with folate-chitosan DNA nanoparticle containing interleukin-1 receptor antagonist gene in rats with adjuvant-induced arthritis. **Mol Ther**, v. 16, n. 7, p. 1243-51, Jul 2008.

FERRUA, F.; BRIGIDA, I.; AIUTI, A. Update on gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 10, n. 6, p. 551-6, Dec 2010.

FERRUTI, P. et al. A novel chemical modification of poly-L-lysine reducing toxicity while preserving cationic properties. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater*, 1997. p.45-46.

FISCHER, D. et al. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. **Pharm Res**, v. 16, n. 8, p. 1273-9, Aug 1999.

FISCHER, D. et al. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1121-31, Mar 2003.

FLOCH, V. et al. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. **J Med Chem**, v. 43, n. 24, p. 4617-28, Nov 30 2000.

GALED, G. et al. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. **Carbohydrate polymers**, v. 62, n. 4, p. 316-320, 2005.

GERASIMENKO, D. V. et al. [Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v. 40, n. 3, p. 301-6, May-Jun 2004.

GHOSN, B. et al. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. **Oligonucleotides**, v. 20, n. 3, p. 163-72, Jun 2010.

GIACCA, M. **Gene therapy**. Dordrecht ; New York: Springer, 2010. xxi, 303 p. ISBN 8847016428 9788847016439.

GINN, S. L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. **J Gene Med**, v. 15, n. 2, p. 65-77, Feb 2013.

GUENIN, E. et al. Cationic Phosphonolipids Containing Quaternary Phosphonium and Arsonium Groups for DNA Transfection with Good Efficiency and Low Cellular Toxicity**. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 39, n. 3, p. 629-631, Feb 2000.

HEILBRONN, R.; WEGER, S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. **Handb Exp Pharmacol**, n. 197, p. 143-70, 2010.

HELLER, L. C.; UGEN, K.; HELLER, R. Electroporation for targeted gene transfer. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 2, n. 2, p. 255-68, Mar 2005.

HELMICK, C. G. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 15-25, 2008.

HOLZERNY, P. et al. Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. **J Control Release**, v. 157, n. 2, p. 297-304, Jan 30 2012.

HORIUCHI, S.; AOYAMA, Y. Systematic lactose-functionalization of amphiphilic octaamine macrocycle as a gene carrier. Optimization of the charge, size, toxicity, and receptor factors for hepatocyte targeting. **J Control Release**, v. 116, n. 2, p. 107-14, Nov 28 2006.

HUANG, M. et al. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. **J Control Release**, v. 106, n. 3, p. 391-406, Sep 2 2005.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharm Res**, v. 21, n. 2, p. 344-53, Feb 2004.

JAYAKUMAR, R. et al. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **Int J Biol Macromol**, v. 40, n. 3, p. 175-81, Feb 20 2007.

JEONG, J. H. et al. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). **J Control Release**, v. 73, n. 2-3, p. 391-9, Jun 15 2001.

JIANG, H. L. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. **J Control Release**, v. 117, n. 2, p. 273-80, Feb 12 2007.

JIANG, H. L. et al. Chitosan-graft-spermine as a gene carrier in vitro and in vivo. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, n. 1, p. 36-42, Jan 2011.

JIAO, T. F. et al. Synthesis and characterization of chitosan-based Schiff base compounds with aromatic substituent groups. **Iranian Polymer Journal**, v. 20, n. 2, p. 123-136, 2011.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 477-488, 4/5/ 2007.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 497-508, 3/7/ 2008.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 801-810, 3/17/ 2010.

KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **J Control Release**, v. 115, n. 2, p. 216-25, Oct 10 2006.

KATCHALSKY, A.; SHAVIT, N.; EISENBERG, H. Dissociation of weak polymeric acids and bases. **Journal of Polymer Science**, v. 13, n. 68, p. 69-84, 1954.

KEAN, T.; ROTH, S.; THANOU, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. **J Control Release**, v. 103, n. 3, p. 643-53, Apr 18 2005.

KIANG, T. et al. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, v. 25, n. 22, p. 5293-301, Oct 2004.

KIM, T.-H. et al. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 726-753, 7// 2007.

KIM, T. H. et al. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3783-92, Aug 2004.

KIM, Y. J. et al. Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from a newly screened *Mortierella* sp. DY-52. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 4, p. 759-66, Apr 2008.

KLEMM, A. R.; YOUNG, D.; LLOYD, J. B. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. **Biochem Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 41-6, Jul 1 1998.

KOOTSTRA, N. A.; VERMA, I. M. Gene therapy with viral vectors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 43, p. 413-39, 2003.

KÖPING-HÖGGÅRD, M. et al. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. **The Journal of Gene Medicine**, v. 5, n. 2, p. 130-141, 2003.

KOPING-HOGGARD, M. et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. **Gene Ther**, v. 8, n. 14, p. 1108-21, Jul 2001.

KOPING-HOGGARD, M. et al. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. **Gene Ther**, v. 11, n. 19, p. 1441-52, Oct 2004.

KRESINA, T. F. **An introduction to molecular medicine and gene therapy**. Wiley Online Library, 2001.

KUDAIBERGENOV, S. E. **Polyampholytes : synthesis, characterization, and application**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. x, 214 p. ISBN 030646781X.

LAEMMLI, U. K. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 11, p. 4288-92, Nov 1975.

LAVERTU, M. et al. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 27, n. 27, p. 4815-24, Sep 2006.

LAVERTU, M. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **J Pharm Biomed Anal**, v. 32, n. 6, p. 1149-58, Aug 21 2003.

LAYMAN, J. M. et al. Influence of polycation molecular weight on poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-mediated DNA delivery in vitro. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1244-52, May 11 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th. New York: W.H. Freeman, 2005. ISBN 0716743396.

LIBERDA, J. et al. Preparation of Biotinylated and FITC-Labelled Phosphorylcholine Poly (acrylamide) Derivatives and Their Application for Protein Ligand-Binding Studies. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 528-532, 1999.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 31-69, 2010.

LIU, G. et al. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34379-87, Sep 14 2001.

LIU, W. et al. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2705-11, May 2005.

LIU, X. et al. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1280-1288, 2// 2007.

LOW, P. S.; KULARATNE, S. A. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 256-262, 6// 2009.

LUNGWITZ, U. et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 60, n. 2, p. 247-66, Jul 2005.

LV, H. et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **J Control Release**, v. 114, n. 1, p. 100-9, Aug 10 2006.

MA, B. et al. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 3, p. 184-194, 11/20/ 2007.

MACLAUGHLIN, F. C. et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. **J Control Release**, v. 56, n. 1-3, p. 259-72, Dec 4 1998.

MADY, M. et al. Effect of the polymer molecular weight on the DNA/PEI polyplexes properties. **Rom. J. Biophys**, v. 21, n. 2, p. 151-165, 2011.

MALMO, J. et al. siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. **J Control Release**, v. 158, n. 2, p. 261-8, Mar 10 2012.

MATSUDA, Y. et al. Dimensions of a free linear polymer and polymer immobilized on silica nanoparticles of a zwitterionic polymer in aqueous solutions with various ionic strengths. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 8772-8, Aug 19 2008.

MEASE, P. J. et al. Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 8, p. 1247-54, Aug 2009.

MENG, S. et al. Phosphorylcholine modified chitosan: Appotent and safe material for cells. **Carbohydrate polymers**, v. 70, n. 1, p. 82-88, 2007.

MIMA, S. et al. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 28, n. 6, p. 1909-1917, 1983.

MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chemical reviews**, v. 109, n. 2, p. 259-302, 2008.

MORÁN, M. et al. Chitosan-DNA particles for DNA delivery: Effect of chitosan molecular weight on formation and release characteristics. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 10, p. 1494-1499, 2009.

NAKASHIMA-MATSUSHITA, N. et al. Selective expression of folate receptor β and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 8, p. 1609-1616, 1999.

NALDINI, L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 5, p. 301-315, 2011.

NEU, M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine) and its derivatives. **The journal of gene medicine**, v. 7, n. 8, p. 992-1009, 2005.

NEWMAN, C. M.; BETTINGER, T. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. **Gene Ther**, v. 14, n. 6, p. 465-75, Mar 2007.

NIMESH, S. et al. Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. **Mol Biotechnol**, v. 46, n. 2, p. 182-96, Oct 2010.

O'BRIEN, J.; LUMMIS, S. C. An improved method of preparing microcarriers for biolistic transfection. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 10, n. 1, p. 12-5, Aug 2002.

O'DONNELL, S. et al. Life with arthritis in Canada: a personal and public health challenge. **Chronic Dis Inj Can**, v. 31, n. 3, p. 135-6, Jun 2011.

OHSAKI, M. et al. In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine). **Bioconjug Chem**, v. 13, n. 3, p. 510-7, May-Jun 2002.

OLINS, D. E.; OLINS, A. L. Model nucleohistones: the interaction of F1 and F2a1 histones with native T7 DNA. **J Mol Biol**, v. 57, n. 3, p. 437-55, May 14 1971.

OLIVEIRA, F. D. P. P. **Síntese, Caracterização e Estudo Físico-Químico das Nanopartículas Formadas pela Interação de Amino Derivados de Quitosana com DNA**. 2011. Dissertação de Mestrado Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

OLIVEIRA, F. P. P. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, n. 5, p. 055101, Feb 8 2013.

PATNAIK, S. et al. PEI-alginate nanocomposites as efficient in vitro gene transfection agents. **J Control Release**, v. 114, n. 3, p. 398-409, Sep 12 2006.

PENISTON, Q. P. J., E. L. Process for depolymerization of chitosan. **U.S. Patent: 3922260**, 11/25/1975 1975.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Characterization of shrimp shell deproteinization. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1380-5, Sep-Oct 2003a.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 12-8, Jan-Feb 2003b.

PICOLA, I. P. D. et al. Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 5, p. 539-552, 2013/07/01 2012.

PUTNAM, D. et al. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 3, p. 1200-5, Jan 30 2001.

PUVVADA, Y. S.; VANKAYALAPATI, S.; SUKHAVASI, S. Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 9, p. 258-263, 2012.

RAYMOND, L.; MORIN, F.; MARCHESSAULT, R. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate research**, v. 246, p. 331-336, 1993.

READ, M. L. et al. Characterisation of the binding interaction between poly(L-lysine) and DNA using the fluorescamine assay in the preparation of non-viral gene delivery vectors. **FEBS Lett**, v. 461, n. 1-2, p. 96-100, Nov 12 1999.

RICHARD, I. et al. Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan-DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 6, p. 1732-40, Jun 10 2013.

RICHARDSON, S. C.; KOLBE, H. V.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. **Int J Pharm**, v. 178, n. 2, p. 231-43, Feb 15 1999.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 5, n. 3, p. 267-276, 1999/06/01 1999.

ROBERTS, G. A. F. THIRTY YEARS OF PROGRESS IN CHITIN AND CHITOSAN. **Progress on chemistry and application of chitin and its ...** v. XIII, p. 7-15, 2008.

RYSER, H. J.-P. A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. **Nature**, v. 215, p. 934-936, 1967.

SASHIWA, H. et al. Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1250-4, Sep-Oct 2003.

SATO, T.; ISHII, T.; OKAHATA, Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2075-80, Aug 2001.

SATOH, T. et al. 6-Amino-6-deoxy-chitosan. Sequential chemical modifications at the C-6 positions of N-phthaloyl-chitosan and evaluation as a gene carrier. **Carbohydr Res**, v. 341, n. 14, p. 2406-13, Oct 16 2006.

SCHOLZ, C.; WAGNER, E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 554-65, Jul 20 2012.

SINGH, A. K.; KASINATH, B. S.; LEWIS, E. J. Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1120, n. 3, p. 337-342, 4/17/ 1992.

SONAWANE, N. D.; SZOKA, F. C., JR.; VERKMAN, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45, p. 44826-31, Nov 7 2003.

STRAND, S. P. et al. Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3357-66, Nov-Dec 2005.

STRAND, S. P. et al. Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 11, p. 3268-76, Nov 2008.

STRAND, S. P. et al. Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 975-87, Feb 2010.

THANOOU, M. et al. Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 153-9, Jan 2002.

THIBAUT, M. et al. Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. **Biomaterials**, v. 32, n. 20, p. 4639-46, Jul 2011.

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 5, p. 346-58, May 2003.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3151-6, Nov 2006.

TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, n. 7, p. 2463-2469, 3// 2000.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567-75, Apr 1997.

TOMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydr Res**, v. 333, n. 2, p. 137-44, Jul 3 2001.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 52, n. 2, p. 105-15, Nov 5 2001.

UNDERWOOD, L. siRNA gene silencing for therapeutic purposes. **Basic Biotechnology eJournal**, v. 6, n. 1, 2010.

VAN DE WETERING, P. et al. Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/plasmid complexes. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 1, p. 59-69, 11/10/ 1997.

VAN DER WOUDE, I. et al. Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 4, p. 1160-5, Feb 18 1997.

VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of physical biochemistry**. 2nd. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall, 2006. xiii, 710, 27 p. ISBN 0130464279

9780130464279.

VANDEVORD, P. J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **J Biomed Mater Res**, v. 59, n. 3, p. 585-90, Mar 5 2002.

VARKOUHI, A. K. et al. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. **J Control Release**, v. 151, n. 3, p. 220-8, May 10 2011.

VERHEUL, R. J. et al. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. **Biomaterials**, v. 29, n. 27, p. 3642-9, Sep 2008.

VILA, A. et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 57, n. 1, p. 123-31, Jan 2004.

WANG, W. et al. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. **Int J Biol Macromol**, v. 13, n. 5, p. 281-5, Oct 1991.

WANG, Y. Q. et al. Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 693-704, 2012.

WARD, C. M.; READ, M. L.; SEYMOUR, L. W. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2221-9, Apr 15 2001.

WIGHTMAN, L. et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. **J Gene Med**, v. 3, n. 4, p. 362-72, Jul-Aug 2001.

WILLIAMS, D. A. RAC reviews serious adverse event associated with AAV therapy trial. **Mol Ther**, v. 15, n. 12, p. 2053-4, Dec 2007.

WONG, R. D., AILEEN M.; BADLEY, ELIZABETH; GREWAL, RAMANDIP; MOHAMMED, MALAIKA. Prevalence of arthritis and Rheumatic Diseases around the world. A Growing Burden and Implications for Health Care Needs. **Arthritis Community Research and Evaluation Unit**, 2010.

WU, G. Y.; WU, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. **J Biol Chem**, v. 262, n. 10, p. 4429-32, Apr 5 1987.

WU, G. Y.; WU, C. H. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. **J Biol Chem**, v. 263, n. 29, p. 14621-4, Oct 15 1988.

WU, T.; ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 248-253, 7/19/ 2008.

XIE, H. J., ZHENGYU; HUANG, JINHUI; ZHANG, CUIRONG. Preparation of Low Molecular Weight Chitosan by Complex Enzymes Hydrolysis. **International Journal of Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 180-186, 06/2011 2011.

YANG, S. J. et al. Effect of chitosan-alginate nanoparticles and ultrasound on the efficiency of gene transfection of human cancer cells. **J Gene Med**, v. 12, n. 2, p. 168-79, Feb 2010.

YOU, Y. Z. et al. Reducible poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate): synthesis, cytotoxicity, and gene delivery activity. **J Control Release**, v. 122, n. 3, p. 217-25, Oct 8 2007.

YUAN, Y. et al. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. **Materials**, v. 4, n. 8, p. 1399-1416, 2011.

ZAMBITO, Y. et al. Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. **Eur J Pharm Sci**, v. 29, n. 5, p. 460-9, Dec 2006.

ZANTA, M. A. et al. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. **Bioconjug Chem**, v. 8, n. 6, p. 839-44, Nov-Dec 1997.

ZHANG, H. et al. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2461-8, Nov-Dec 2004.

ZHANG, Y. et al. Design and biophysical characterization of bioresponsive degradable poly(dimethylaminoethyl methacrylate) based polymers for in vitro DNA transfection. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 2, p. 313-22, Feb 13 2012.

ZHONG, Z. et al. Low molecular weight linear polyethylenimine-b-poly(ethylene glycol)-b-polyethylenimine triblock copolymers: synthesis, characterization, and in vitro gene transfer properties. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3440-8, Nov-Dec 2005.

ZOU, S. M. et al. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. **J Gene Med**, v. 2, n. 2, p. 128-34, Mar-Apr 2000.

APÊNDICE A

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados da série I estão apresentados nas Figuras 46, 47, 48, 49, 50, 51 e 52.

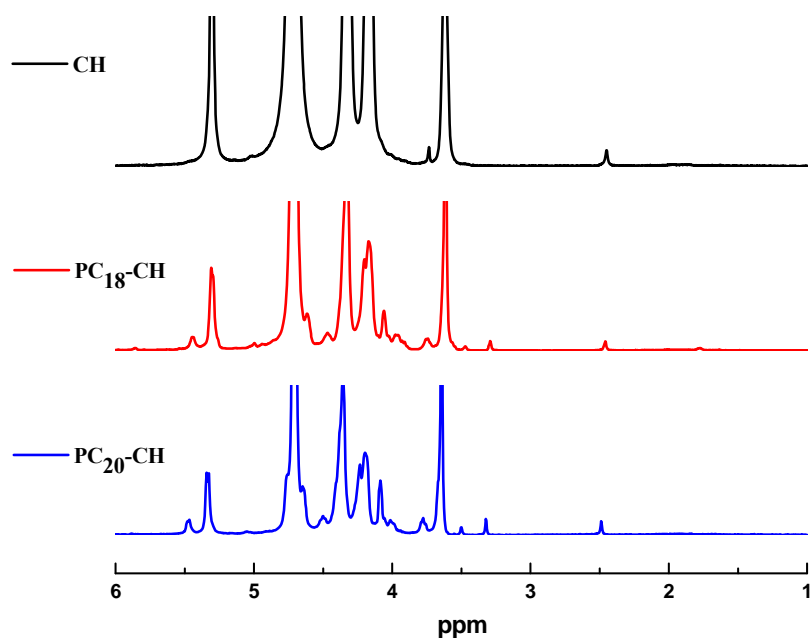


Figura 46. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos polímeros CH, PC₁₈-CH e PC₂₀-CH em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

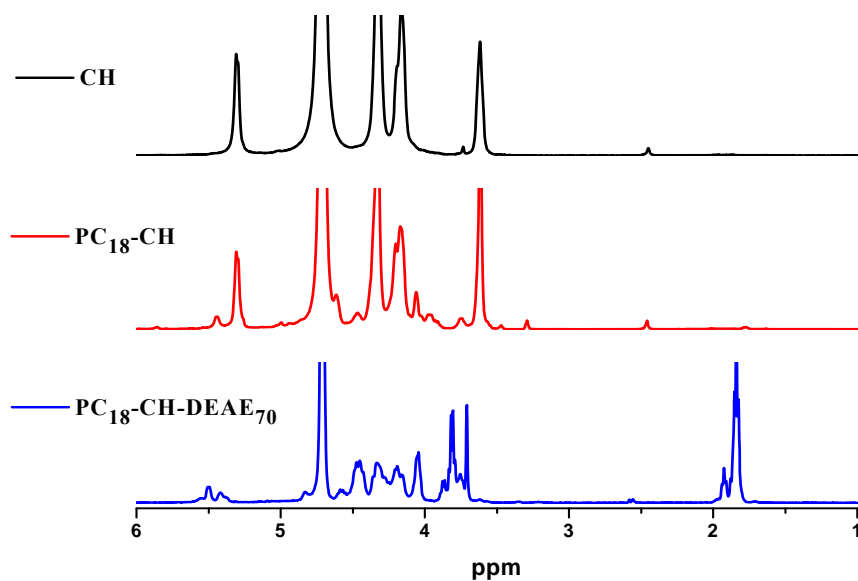


Figura 47. Espectros de RMN de ¹H, 400 MHz, dos polímeros CH, PC₁₈-CH e PC₁₈-CH-DEAE₇₀ em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

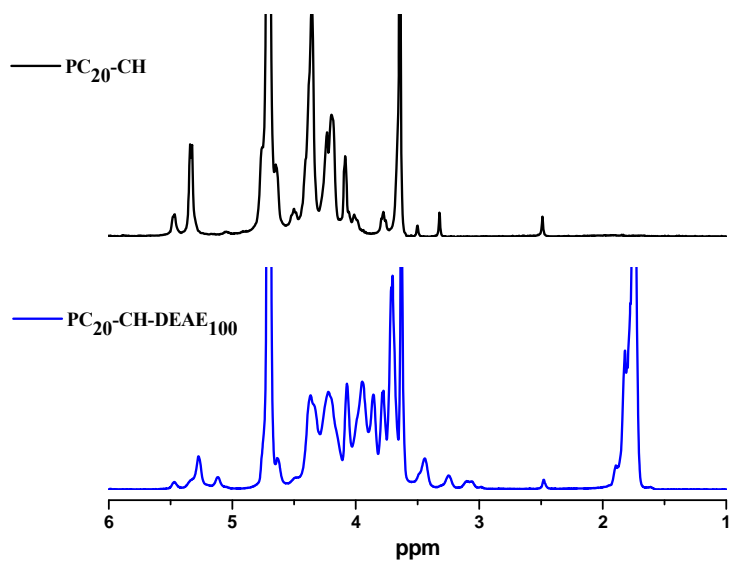


Figura 48. Espectros de RMN de ¹H, 400 MHz, dos polímeros PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

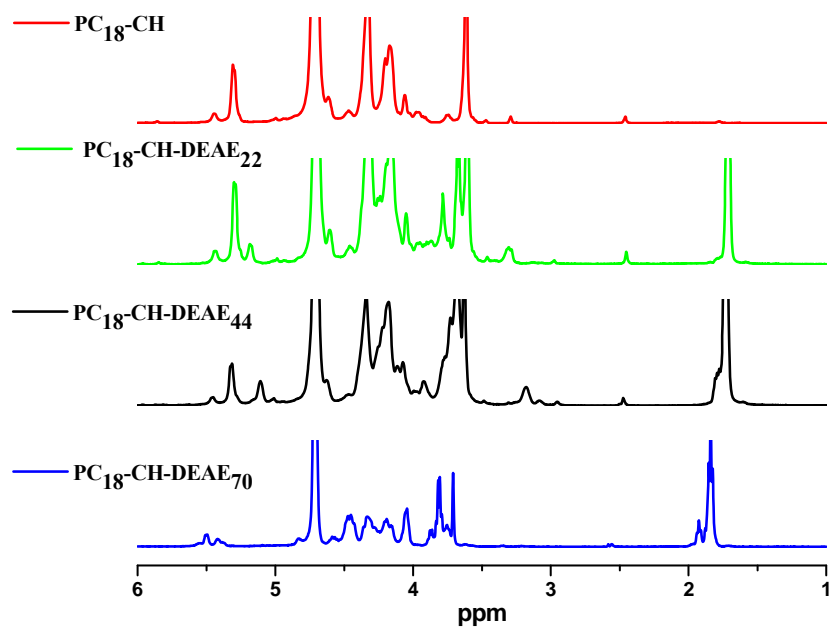


Figura 49. Espectros de RMN de ^1H , 400 MHz, dos polímeros PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₂₂, PC₁₈-CH-DEAE₄₄ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀ em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

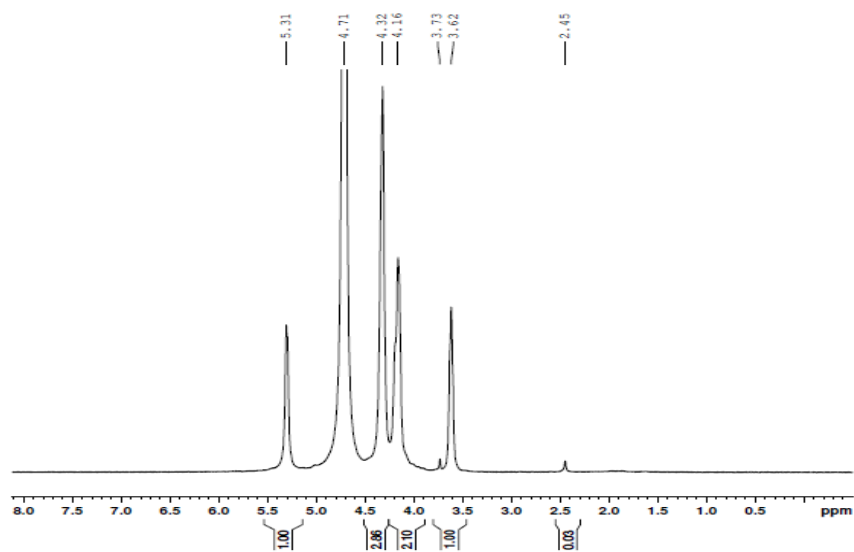


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero CH em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

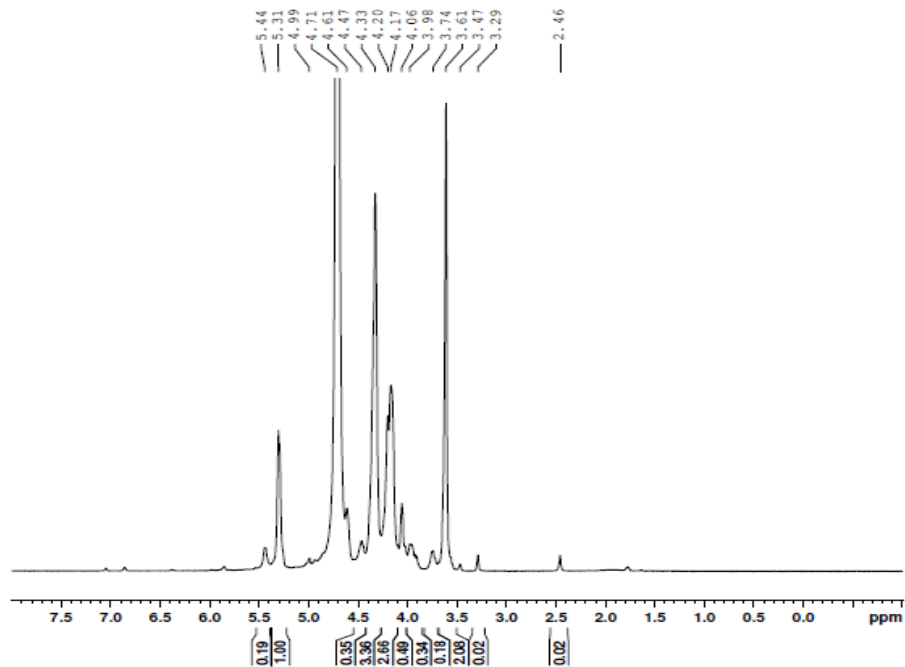


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero PC₂₀-CH em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

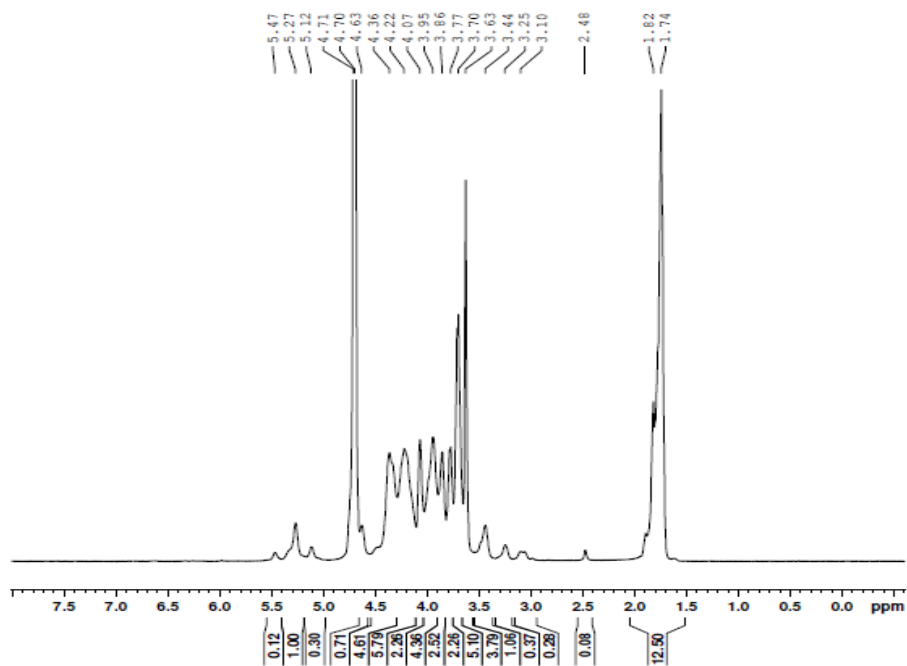


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, do polímero PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀ em D₂O/DCI (100/1, v/v) à 70 °C.

A seguir estão expostas as curvas de titulação potenciométrica e condutométrica dos derivados da série I (Figuras 53, 54, 55 e 56).

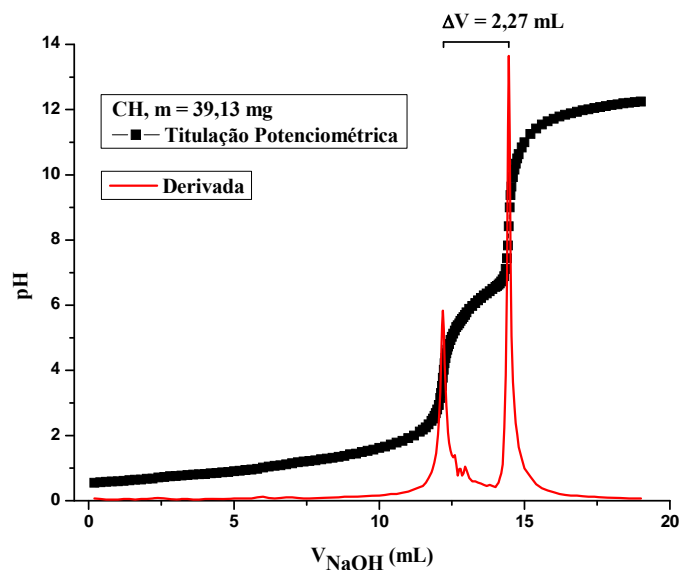


Figura 53. Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada CH.

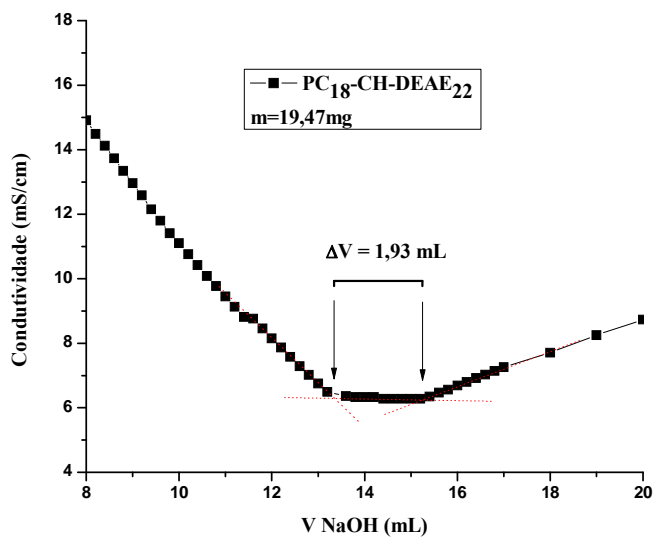


Figura 54. Titulação condutométrica do derivado $\text{PC}_{18}\text{-CH-DEAE}_{22}$.

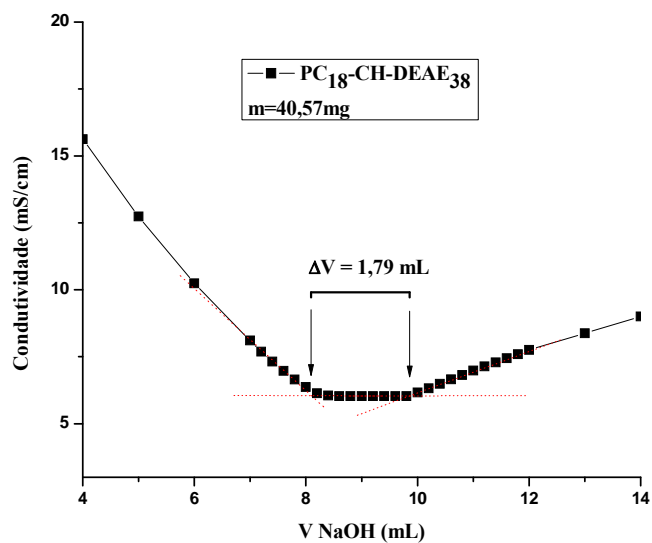


Figura 55. Titulação condutométrica do derivado PC₁₈-CH-DEAE₃₈.

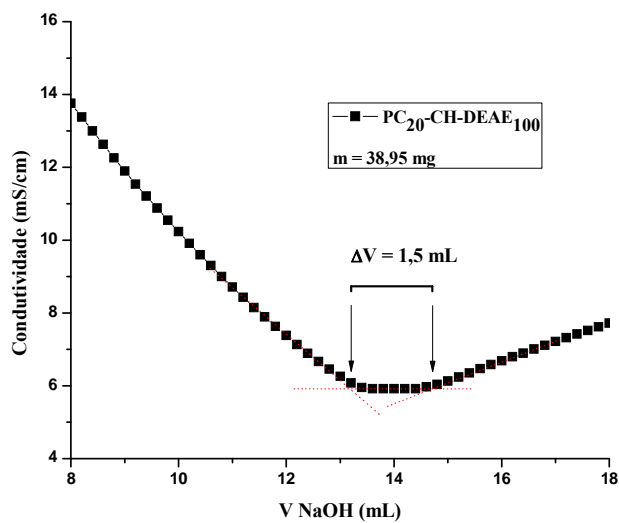


Figura 56. Titulação condutométrica do derivado PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀.

As titulações potenciométricas dos derivados da série I, realizadas para os cálculos de capacidade de tamponamento, estão apresentadas nas Figuras 57, 58 e 59.

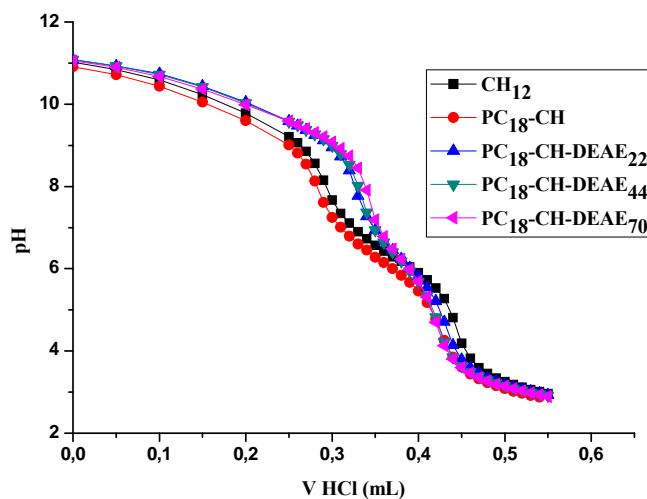


Figura 57. Titulações potenciométricas dos derivados CH₁₂, PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₂₂, PC₁₈-CH-DEAE₄₄ e PC₁₈-CH-DEAE₇₀.

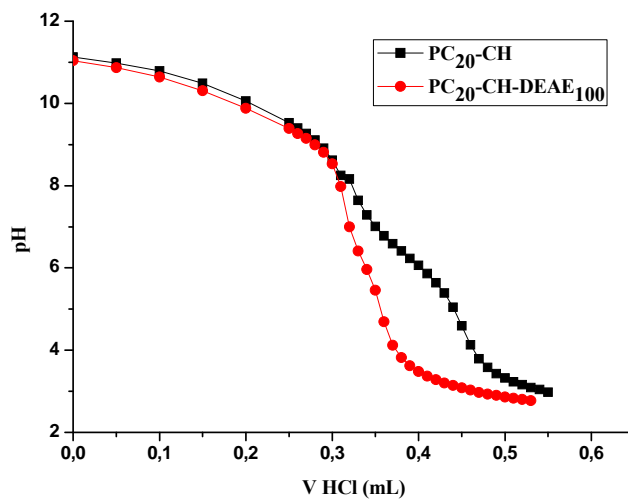


Figura 58. Titulações potenciométricas dos derivados PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀.

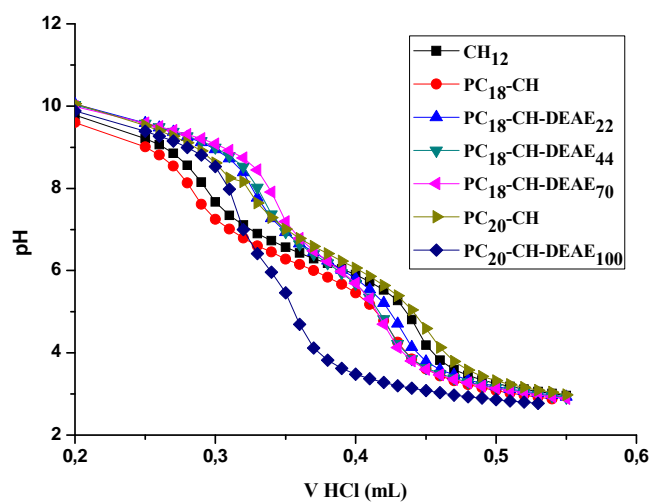


Figura 59. Titulações potenciométricas de todos os derivados da série I.

Curva de calibração com o padrão Pullulan para os experimentos de GPC, os cromatogramas de GPC dos derivados da série I e os resultados de M_w , M_n e M_w/M_n estão expostas a seguir nas Figuras 60, 61, 62, 63 e na Tabela 7.

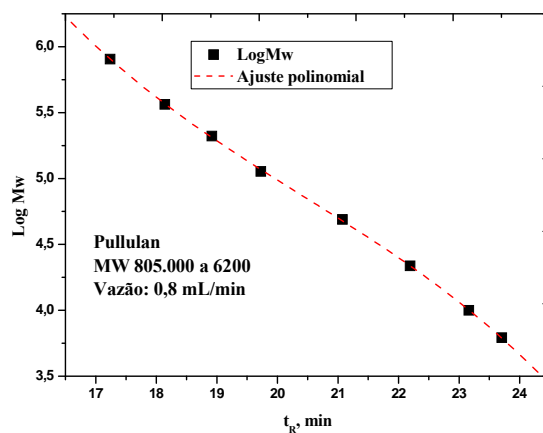


Figura 60. Curva de calibração com ajuste polinomial do padrão Pullulan dos cromatogramas de GPC.

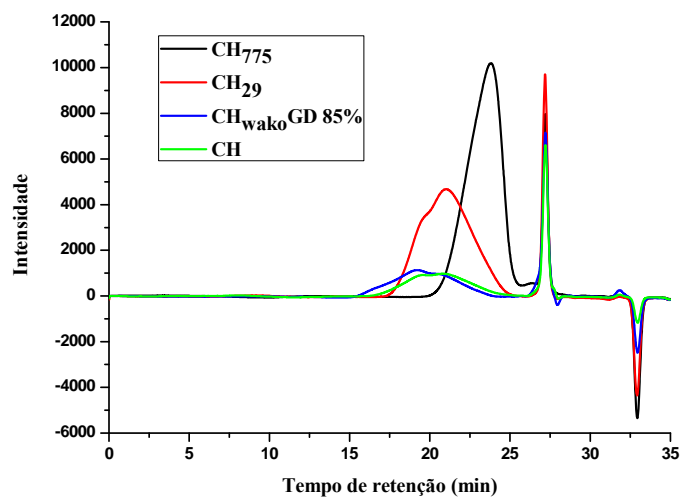


Figura 61. Cromatogramas da GPC das quitosanas, CH₁₂, CH₂₉, CH e da quitosana de partida para obtenção da CH (CH_{wako}, GD 85%).

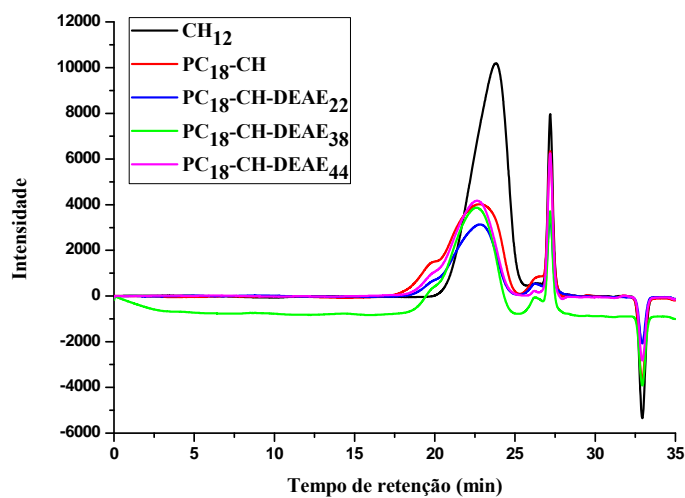


Figura 62. Cromatogramas da GPC dos polímeros CH₁₂, PC₁₈-CH, PC₁₈-CH-DEAE₂₂, PC₁₈-CH-DEAE₃₈ e PC₁₈-CH-DEAE₄₄.

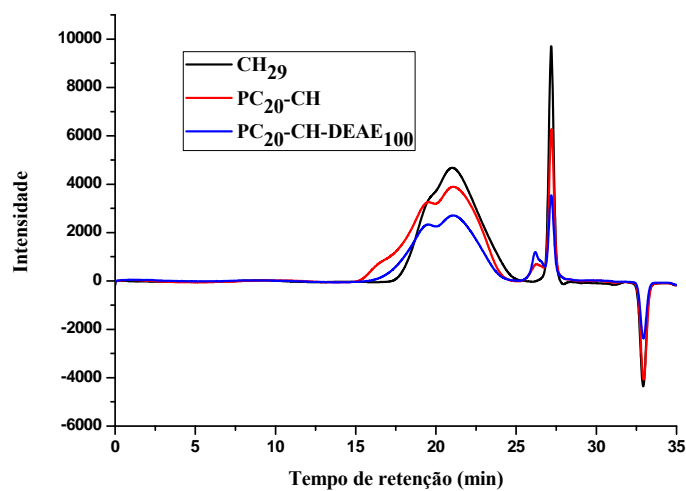


Figura 63. Cromatogramas da GPC dos polímeros CH₂₉, PC₂₀-CH e PC₂₀-CH-DEAE₁₀₀.

Tabela 7. Resultados de Mw, Mn e Mw/Mn dos polímeros da série I, em g.mol⁻¹.

Amostra	Duplicata Mw		Duplicata Mn		Duplicata Mw/Mn	
	A	B	A	B	A	B
CH ₂₉	76208	74290	25242	24810	3	2,9
PC ₁₈ -CH	42785	39591	12377	12154	3,4	3,2
CH ₁₂	12046	12117	6130	6181	1,9	1,9
PC ₁₈ -CH-DEAE ₂₂	29245	29309	13149	13016	2,2	2,3
PC ₂₀ -CH	241732	-	13149	-	6,5	-
CH-WAKO-GD 0.85	352344	-	62764	-	5,6	-
PC ₁₈ -CH-DEAE ₃₈	32363	33306	14351	14409	2,3	2,3
PC ₁₈ -CH-DEAE ₄₄	31705	32771	13764	13886	2,3	2,4
PC ₂₀ -CH-DEAE ₁₀₀	135890	132182	36974	35624	3,7	3,7
CH	133884	-	-	31946	4,2	-

APÊNDICE B

Artigo publicado durante o período do presente trabalho de doutorado:

- Oliveira, F.P.P., Picola, I.P.D., Shi, Q., Tiera, V.A.O., Fernandes, J.C., Tiera, M.J.;
Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the *in vitro* transfection efficiency, Nanotechnology 24 (2013).

Synthesis and evaluation of diethylethylamine–chitosan for gene delivery: composition effects on the *in vitro* transfection efficiency

Franciele de Paula Pansani Oliveira^{1,4}, Isadora Pfeifer Dalla Picola^{1,2,3,4}, Qin Shi², Hellen Franciane Gonçalves Barbosa¹, Vera Aparecida de Oliveira Tiera¹, Júlio Cesar Fernandes² and Marcio José Tiera¹

¹ Department of Chemistry and Environmental Sciences, IBILCE, São Paulo State University—UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

² Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, —Université de Montréal, Canada

³ Department of Physics, IBILCE, São Paulo State University—UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

E-mail: mjt@ibilce.unesp.br

Received 9 September 2012, in final form 21 December 2012

Published 11 January 2013

Online at stacks.iop.org/Nano/24/055101

Abstract

Chitosan has been indicated as a safe and promising polycation vector for gene delivery. However its low transfection efficiency has been a challenging obstacle for its application. To address this limitation, we synthesized chitosan derivatives which had increasing amounts of diethylethylamine groups (DEAE) attached to the chitosan main chain. The plasmid DNA VR1412 (pDNA), encoding the β -galactosidase (β -gal) reporter gene was used to prepare nanoparticles with the chitosan derivatives, and the transfection studies were performed with HeLa cells. By means of dynamic light scattering and zeta potential measurements, it was shown that diethylethylamine–chitosan derivatives (DEAE_x–CH) were able to condense DNA into small particles having a surface charge depending on the polymer/DNA ratio (N/P ratio). Nanoparticles prepared with derivatives containing 15 and 25% of DEAE groups (DEAE₁₅–CH and DEAE₂₅–CH) exhibited transfection efficiencies ten times higher than that observed with deacetylated chitosan (CH). For derivatives with higher degrees of substitution (DS), transfection efficiency decreased. The most effective carriers showed low cytotoxicity and good transfection activities at low charge ratios (N/P). Vectors with low DS were easily degraded in the presence of lysozyme at physiological conditions *in vitro* and the nontoxicity displayed by these vectors opens up new opportunities in the design of DEAE–chitosan-based nanoparticles for gene delivery.

 Online supplementary data available from stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Non-viral gene therapy has been a subject of intense research over the past twenty years and most of the recent studies have

focused on the improvement of the transfection efficiency [1]. In this respect the use of polycations as carriers for gene therapy has also been greatly limited by the low transfection efficiency, and the design of new polycations to overcome the deficiencies is an active field of research [2]. Chitosan, a natural polysaccharide, has been recognized for a long

⁴ These two authors contributed equally to this work.

time as being a safe carrier due to its biocompatibility, biodegradability and low cytotoxicity [3]. Besides its strong interaction with nucleic acids, chitosan provides the needed protection against nucleases in the intracellular environment. However, chitosan has a limited solubility at neutral pH that leads to formation of a hydrophobic coat on the chitosan–DNA nanoparticles, which may lead to lower zeta potentials and to nanoparticle aggregation, which in turn may affect the cellular uptake and the transfection efficiency [4, 18]. After internalization, nanoparticles must be able to deliver the DNA inside the cytosol through an efficient endosomal escape that is a key parameter to the progress of the therapy [5, 6]. The plasmid DNA (pDNA) delivery requires overcoming the electrostatic attraction between the polycation and the nucleic acid as well as the breaking of secondary forces such as hydrophobic interactions and hydrogen bondings [7].

The transfection efficiencies of chitosan-based nanoparticles have been improved by varying some parameters of the chitosan's structure, such as charge density, molecular weight and buffering capacity. Several approaches have been used to improve the chitosan's buffering capacity, aiming to increase the endosomal escape of chitosan–DNA nanoparticles [8–11]. Sun *et al* have attached short peptides to chitosan to facilitate the intracellular DNA unpacking to optimize the transfection efficiency of the CH/DNA complex. However, although the conjugation of peptides has improved the transfection efficiency of chitosan to a large extent, it remains not comparable to lipofectamine [8]. Grafting of polyethyleneimine (PEI) on chitosan has been used by several authors, and most of the studies show that PEI-g-chitosan exhibits higher transfection efficiencies than those of PEI (25 K) itself, both *in vitro* and *in vivo* [12–14].

Other approaches that can be employed to improve the transfection efficiency are the adjustment of molecular weight and/or charge density to control the strength of interaction between chitosan and DNA [15, 16]. Lavertu *et al* showed that by controlling the degree of deacetylation (DDA) and the molecular weight (Mw) of chitosan, it was possible to maximize the gene expression. Their study showed that high gene expression was obtained for high MW/DDA chitosans at low N/P ratios, while a low MW/DDA was more effective at higher N/P charge ratios [17]. However, a higher cell uptake is observed when pH is lower than 7.0 and the complexes are positively charged with sizes below 1 μm [4]. A positively charged surface is particularly important to promote an efficient cellular uptake as well as to maintain the colloidal stability of the chitosan/DNA nanoparticles. Strand *et al* showed that pH can have a high impact on the gene transfer efficacy of chitosans. The authors showed that the ionization degree (α) of chitosan is sensitive to pH and this affected the luciferase gene expression in HEK293 mediated by linear chitosan oligomers, which decreased drastically at pH > 7.2. However, colloiddally stable complexes formed by the interaction of DNA with self-branched glycosylated chitosan oligomers showed a higher transfection efficiency at pH values higher than 7.2 [18]. The attachment of additional cationic groups on the chitosan backbone may

increase the ability of chitosan to interact with DNA by increasing cellular uptake and transfection efficiency [19]. Higher transfection efficiencies have also been reported for nanoparticles prepared with trimethylated chitosans [20]. However, since the interaction between chitosan and DNA is mainly electrostatic, and accordingly strong, it might prevent the unpacking of DNA from its carrier. Bhise *et al* synthesized an acrylate-terminated poly(1,4-butanediol diacrylate-co-5-amino-1-pentanol), which was subsequently end-capped with amine-containing small molecules with primary and tertiary amine groups, aiming to increase the intracellular delivery. The synthesized polymers were more effective for gene delivery than FuGENE[®]-HD. The most effective polymers were those end-capped with tertiary amine groups, indicating that the presence of tertiary amines could potentially aid in buffering the endosomal pH and thereby enhance the transfection efficiency [21].

We have previously shown that phosphorylcholine groups grafted onto the chitosan framework increased the colloidal stability of nanoparticles prepared by the interaction of these derivatives with DNA [22]. Moreover, the strength of interaction between DNA and the chitosan derivatives decreased and secondary amino groups generated on the chitosan structure had a pKa around 7.0, which allowed positively charged nanoparticles to be obtained near the physiological pH.

The main goal of this work was to attach diethylaminoethyl groups (DEAE) to the chitosan structure to provide higher colloidal stability and improved buffering capacity to nanoparticles. The attaching of these groups may provide higher zeta potentials and colloidal stability to the nanoparticles, i.e., these groups are highly hydrophilic and remain partially protonated at the physiological pH. The increasing colloidal stability and higher buffering capacities may favor the uptake process and the nucleic acid delivery in the cytosol, increasing the transfection efficiency. Transfection studies were comparatively carried out and discussed, taking into account the composition of derivatives and their buffering capacities and degrees of ionization (α).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan (CH, degree of deacetylation (DDA) 85%) was purchased from Polymar Co., Brazil. Sodium hydroxide, sodium acetate, acetic acid and 2-Chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (DEAE) were purchased from Aldrich Chemical Co. Spectra/Pore membranes (Spectrum) were employed for dialysis. Water was deionized using a Milli-Q water purification system (Millipore). Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin–EDTA solution, penicillin–streptomycin (PS) mixture, agarose, ethidium bromide and lipofectamine reagent were purchased from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON, Canada). Other chemicals, if not otherwise stated, were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). All solvents were of reagent grade and used as received.

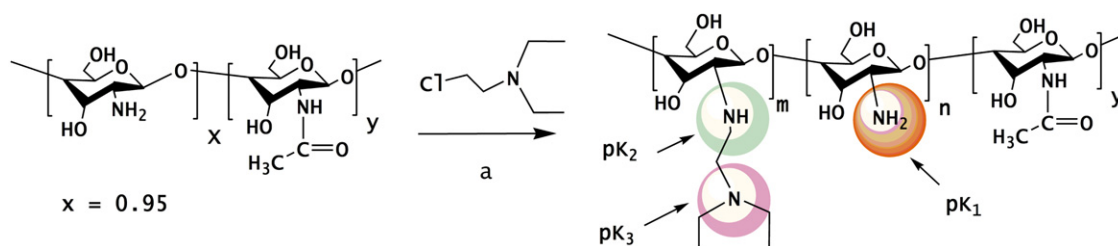


Figure 1. Scheme of synthesis for DEAE-CH derivatives; pK_1 , pK_2 and pK_3 indicate the three available amino groups.

Table 1. Properties of chitosan and its derivatives used for pDNA condensation and transfection studies.

Derivative	DEAE/NH ₂ ratio	(η) (ml g ⁻¹)	M_v (g mol ⁻¹) $\times 10^3$	DS (%) ^a	DSq (%)	Quaternary units
CH ^b	—	190	17.7	—	—	—
DEAE ₁₅ -CH	0.5	220	21.4	14.9	—	—
DEAE ₂₅ -CH	1.0	218	21.2	24.5	—	—
DEAE ₈₀ -CH	1.5	206	19.7	62.5	15.5	—
DEAE ₁₀₀ -CH	2.0	163	14.5	97.6	16.9	—

^a Determined by ¹H-NMR measurements using equation (1).

^b Degree of deacetylation (DDA) = 95.2% by ¹H-NMR and 94.6% by potentiometric titration.

2.2. Deacetylation of chitosan (DDA)

Deacetylated chitosan was utilized as starting material and the deacetylation process was carried out as previously described [23]. The degree of deacetylation (DDA) was determined by ¹H-NMR and potentiometric titration and the obtained results are collected in table 1.

2.3. Preparation of DEAE-substituted chitosans

Chitosan derivatives (DEAE-CH) were prepared from the previously deacetylated chitosan sample. Chitosan was grafted with varied amounts of *N,N*-diethylethylamine hydrochloride DEAE (figure 1). The procedure is described as follows for the synthesis of DEAE₂₅-CH. A solution of 2-chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (DEAE, 0.5 g, 2.90 mmol) in water (10 ml) was mixed with a solution of deacetylated chitosan (0.5 g, 3.1 mmol monosaccharide residue) in aqueous chloridric acid (20 ml, 0.1 mol l⁻¹). The pH of the reaction mixture was adjusted to 8.0 by adding aqueous NaOH (1.0 M). The reaction mixture was stirred for 2 h at 65 °C and the pH was controlled throughout the course of the reaction by adding 1.0 mol l⁻¹ NaOH from a funnel which was fitted to the reaction flask. The reaction mixture was dialyzed (membrane of MWCO 12–14 000 g mol⁻¹), first against water for 2 days, then against aqueous NaOH (0.05 M) for 1 day, and finally against water for 2 days. The polymer DEAE-CH was isolated by lyophilization. Other DEAE-substituted chitosans were prepared under identical conditions, except for the initial NH₂/DEAE molar ratio (table 1).

2.4. Potentiometric and conductimetric titrations

Solutions of the polymers for titration were prepared by adding HCl (15.0 ml, 0.10 M) to a solution of polymer (CH

or DEAE-CH, ~40 mg). Titration curves for all polymers were obtained by monitoring the pH and conductivity changes upon addition of aqueous NaOH (0.10 M, increments of 50–250 μ l). Titration curves were recorded in the pH range of 2–12.

2.5. Determination of the degree of substitution (DS) by ¹H NMR spectroscopy

Polymer solutions (20 mg ml⁻¹) were prepared in D₂O/DCI (100/1, v/v). Their ¹H NMR spectra were recorded at 70 °C. The degree of substitution (DS) was determined from the areas (I_{CH_3}) of the signal at δ 1.74 ppm attributed to the resonance of the methyl group NH-CH₂-CH₃ (figure 2) and of the signals due to the anomeric protons of substituted and unsubstituted glucosamine residues, H_{1s} and H₁, (signals at 5.4 and 5.32 ppm) respectively (figure 2) using equation (1) :

$$\frac{I_{CH_3}/6}{(I_{H_1} + I_{H_{1s}})} \quad (1)$$

2.6. Determination of buffering capacity and ionization degree of derivatives

The buffering capacities of chitosan and their DEAE-CH derivatives were determined by acid–base titration assay over a pH range of 10–2, as described by Lu *et al* [8]. Briefly, 0.2 mg ml⁻¹ of each sample solution was prepared in 10 ml of 150 mM NaCl solution. The sample solution was first titrated with 0.1 M NaOH to pH 10, and then 0.1 M HCl solution was progressively added to the DEAE-CH solutions to obtain mixtures with different pH values, which were measured using a Digimed microprocessor pH meter. The degrees of ionization (α) as a function of pH were estimated, taking into account the mass of the polymer sample and the volumes of NaOH needed to neutralize the protonated amino

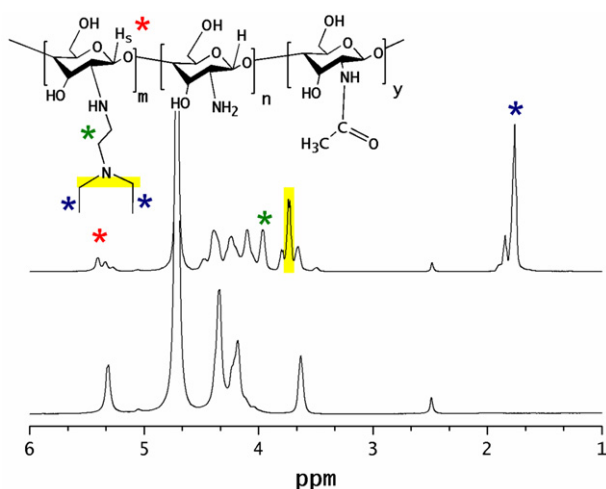


Figure 2. ^1H -NMR spectra of deacetylated chitosan (CH, bottom) and its DEAE-substituted derivative DEAE₁₀₀-CH (top).

groups. These volumes were determined from conductimetric titrations described in the section 2.4. The values for α were estimated as described earlier [23] using the equation (2):

$$\alpha = 1 - (V/V_t) \quad (2)$$

where V is the volume of NaOH added and V_t is the total volume required to neutralize the protonated amino groups determined from potentiometric titrations.

2.7. Instrumentation

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker ARX-500 500 MHz spectrometer. Fluorescence measurements were performed in a Hitachi 4500 spectrofluorimeter in a thermostated cell holder at 25 °C. UV/vis spectra were measured with a Cary 100 spectrophotometer equipped with a Peltier system.

2.8. Viscosity measurements

Viscosity measurements were carried out in a water thermostated bath with a capillary calibrated viscosimeter for dilution Cannon-Ubbelohde 9722M-50 (Cannon Instr. Co.) at pH 4.5 acetic acid (0.3 M)/sodium acetate (0.2 M) buffer. The viscosimeter was immersed in a thermostatic bath at 298.15 ± 0.05 °C and the samples were allowed to equilibrate for 10 min in the bath before measuring. Measurements at each concentration were repeated and the reproducibility was better than ± 0.01 s. The results of the viscosity measurements were expressed as reduced viscosity values calculated from equation 3:

$$\eta_r = \frac{(t - t_0)/t_0}{c} \quad (3)$$

where t is the measured efflux time of the polymer solution, t_0 is the efflux time of the pure solvent, and c is the polymer concentration (g/L). The viscosimetric molecular weight (M_v) was estimated by using the Mark-Houwink-Sakurada equation $[\eta] = K_m M_v^a$, with $K_m = 0.079$ and $a = 0.796$ [24].

2.9. Amplification and purification of plasmid DNA

The plasmid DNA VR1412, encoding the β -galactosidase (β -gal) reporter gene with a CMV promoter and a backbone size of 8100 kbp, was obtained from VICAL Inc. (San Diego, CA, USA). The plasmid DNA was multiplied with *Escherichia Coli* bacteria then isolated and purified using the QIAGEN Plasmid Mega Kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The purified plasmid was then suspended in water. Purity was confirmed with 0.8% agarose gel electrophoresis. The DNA concentration was measured by UV absorption at 260 nm with a Cary 100 spectrophotometer equipped with a Peltier system. All bacteria were grown in GIBCO Invitrogen Corporation Lennox L Broth Base (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada).

2.10. Chitosan and DEAE-Chitosan/plasmid nanoparticle formation

DEAE-CH samples were dissolved in the appropriate buffer (acetic acid/sodium acetate, pH = 5.0 or phosphate pH = 7.4, ionic strength 150 mM) at room temperature. A stock solution of plasmid DNA VR1412 (pDNA) was added to test tubes containing 0.8 ml of the buffer. The phosphate groups of the pDNA was adjusted to 9.0×10^{-5} M as determined by the UV absorption at 260 nm, using a molar extinction coefficient, $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Chitosan and its derivative solutions were then injected into the tubes to obtain nanoparticles with different N/P ratios. Stock solutions (1.0 – 1.5 mg ml^{-1}) of the DEAE-CH samples were used to titrate plasmid DNA solutions, which were briefly vortexed, kept at room temperature for 30 min and analyzed by dynamic light scattering without further treatment. The N/P ratios were calculated using average molecular weights for the chitosan derivatives, which were estimated by taking into account the degrees of substitution of the derivatives.

2.11. Ethidium bromide displacement assay

A stock solution of ethidium bromide (EtBr, 2.5×10^{-3} M) was prepared in water and this solution ($2.5 \mu\text{l}$) was added to the cuvettes containing the appropriate buffers (2 ml of 150 mM, pHs 5.0 and 7.4) and mixed by gentle agitation. A stock solution of DNA was added to the solution to obtain a concentration of 1.5×10^{-5} moles of phosphate. The EtBr-DNA solution was left to rest for 15 min. Then, using microsyringes, solutions containing the DNA-ethidium Bromide (DNA-EtBr) complex were titrated into the cuvette to reach a predetermined monomer:nucleotide molar ratio (N/P ratio). The experiment for deacetylated chitosan (CH) at pH 7.4 was carried out by preparing a stock solution at pH 6.3, which was used to titrate the complex EtBr-pDNA in a phosphate buffer at pH 7.4. After each addition, the solution was briefly stirred prior to measurement of the fluorescence (five readings). The excitation wavelength (λ_{ex}) was set at 560 nm and the emission wavelength (λ_{em}) at 605 nm. Steady-state fluorescence spectra were recorded on

a Hitachi 4500 spectrofluorimeter. The temperature control of the samples was achieved using a water-jacketed cell holder connected to a Fisher circulating water bath. All measurements were carried out at 25.0 ± 0.1 °C unless otherwise stated and the slit settings were 5 nm for both excitation and emission. The total CH and DEAE-CH solutions added to the DNA solution did not exceed 5% of the total volume of the solution, and hence no correction was made for sample dilution.

2.12. Gel electrophoresis of the nanoparticles

Gel electrophoresis was performed with a 0.8% agarose gel in 40 mM Tris-boric acid-EDTA (TBE) buffer at pH 7.4. The DNA-chitosan nanoparticles of N/P ratios of 1–10 were prepared at a constant DNA concentration and incubated for 30 min at room temperature. Next, the nanoparticle solution (20 μ l) was loaded into the agarose gel wells. After electrophoresis (80 V, 1.5 h), the gel was stained with ethidium bromide (0.5 μ g ml⁻¹) and photographed in a MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

2.13. Integrity of DNA after nanoparticle synthesis and nuclease protection assay

25 μ l of nanoparticles was incubated for 4 h at 37 °C with 20 μ l of chitosanase (5 U ml⁻¹) and 5 ml of lysozyme (1000 U ml⁻¹) in a 50 mM NaAc-HOAc buffer at pH 5.0. Samples of naked DNA, undigested and digested nanoparticles were loaded onto a 0.8% agarose gel in Tris-borate EDTA buffer (4.45 mM Tris-base, 1 mM sodium EDTA, 4.45 mM boric acid) at pH 8.0. Chitosan-DNA complexes were loaded (20 μ l of sample containing 0.2 μ g of DNA) on the gel, and electrophoresis was carried out at 55 V for 120 min. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 μ g ml⁻¹) and photographed in a MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) (figure S5 available at stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia).

The protection against nuclease attack was assessed electrophoretically on a 0.8% gel agarose, following the procedure described by Douglas *et al* [34]. Naked DNA (2.0 μ g) and DEAE₁₅-CH /DNA nanoparticles at N/P ratio 2.0 (containing 2.0 μ g of DNA in 40 μ l of acetate buffer, pH 5) were treated with 2.5 U and 5 U of DNaseI and incubated for 30 min at 37 °C. The reactions were stopped inactivating the DNaseI by heating the samples at 60 °C for 15 min in the presence of 25 mM EDTA. Half of the samples (20 μ l) were digested with 16 μ l of chitosanase (5 U ml⁻¹) and 4 μ l of lysozyme (1000 U ml⁻¹) for 4 h at 37 °C. After treatments the samples were analyzed by electrophoresis at 170 V for 30 min (figure S6 available at stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia).

2.14. Zeta potential and light scattering of the chitosan-DNA polyplexes

The zeta potential of nanoparticles and the light scattering measurements were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using the dynamic light scattering technique, on a Zetasizer nano-ZS90, a He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm) and a 90° scattering angle. The temperature was 25 °C unless otherwise stated. The measurements were prepared in triplicate and average sizes were used. The polyplexes were prepared at different N/P ratios and a final plasmid DNA concentration of 6.6 μ g ml⁻¹ at pH 5.0 and 7.4 and 150 mM of ionic strength. The measurements were carried out at 25 °C and the obtained values correspond to the average of three independent preparations.

2.15. Cell culture, transfection protocol and determination of the transfection efficiencies

HeLa cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% PS. The cells were cultured in a 5–95% CO₂-O₂ atmosphere at 37 °C. They were seeded, 24 h prior to transfection, on 24-well plates at a density of 50 000 cells/well in 1 ml of their usual culture medium supplemented with 10% FBS and 1% PS. On the day of transfection, the culture medium was replaced by 500 μ l of complete medium containing either free DNA or nanoparticles having an amount of DNA equivalent to 5 μ g. After 6 h incubation, the cells received 1 ml of complete medium and were incubated until 60 h post-transfection. For quantitative analysis of the β -gal expression, the β -gal ELISA kit (Roche) was used according to the manufacturer's instruction. Briefly, the cells were washed with cold PBS and lysed 60 h after transfection with the lysis buffer included in the kit and the cell extracts were centrifuged at maximum speed for 15 min at 4 °C to remove any debris. The supernatant was then used for the ELISA. β -galactosidase expression was determined as picograms of β -gal per milligram of cellular protein. Total protein content of the samples was measured using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

2.16. Cell proliferation assay

The cells in the wells were seeded with free plasmid DNA VR 1412, or chitosan-DNA complexes or DEAE-CH-DNA complexes followed by an incubation period of 24 h. Cell viability was then evaluated by CellTiter96® aqueous non-radioactive cell proliferation Assay (Promega Corporation) composed of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) and phenazine methosulfate (PMS). MTS is bio-reduced by viable cells to formazan soluble in tissue culture medium. Absorbance was measured at 490 nm with an EL800 universal microplate reader (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA).

2.17. Statistical analysis

All measurements were collected in triplicate and experiments repeated three times. Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical testing was carried out using the one way ANOVA test, with $P < 0.05$ considered as a statistically significant difference.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and structure analysis

To achieve chitosan derivatives with a higher α at neutral pH, we selected to introduce the DEAE groups via chemical modification of the C-2 amine groups, thus, by controlling the pH of the reaction we may avoid the reaction at the hydroxyl groups which play an important part in the biological activity of chitosan derivatives. The reaction path, besides introducing tertiary amino groups to the main chain, converts primary amines of chitosan into secondary amines, a transformation that will affect the protonation state of the native chitosan (figure 1). The DDA, expressed in $-\text{NH}_2$ mol%, determined from the ^1H NMR spectra of the deacetylated sample, was 95.2 mol%. These values were obtained from the areas of the peaks at 3.6 ppm, due to the resonance of the proton (H_2) and of the singlet at 2.5 ppm attributed to the acetamido methyl protons. Potentiometric and conductimetric titrations conducted on solutions of CH confirmed that the deacetylation occurred efficiently, yielding DDA values of 94.6 mol% (figure S1 available at stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia).

The deacetylated chitosan was treated with DEAE, and the degree of substitution was varied by setting the initial molar ratio of DEAE to glucosamine units to values ranging from 0.5 to 2.0. The ^1H NMR spectra of the chitosan derivatives exhibited a singlet at 1.74 ppm, attributed to the resonance of the methyl protons of the diethylethylamine moieties, and signals at δ 3.74 and 3.96 ppm correspond to the resonance of the methylene protons of $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ and $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ respectively (figure 2). The reaction also leads to the formation of small fractions of quaternary diethylethylamine groups for the more substituted derivatives, which were estimated from the signal at 1.84 ppm, using the same relationship presented in section 2.5, and the values are presented in table 1. The attachment of DEAE groups to the chitosan framework brings further changes in the ^1H NMR spectrum of chitosan, most notably in the anomeric proton H-1, whose signal undergoes shifts, from δ 5.32 ppm to δ 5.4 ppm. The degree of substitution, DS, of the DEAE-CH derivatives as determined by using equation (1) ranged from 15 to 117 mol% of DEAE-substituted glucosamine residues (table 1). All derivatives were soluble at neutral pH and the viscosimetric molecular weights (M_v) of the samples are reported in table 1. The M_v of the derivatives varied from 14.5 to 22 kDa and tend to decrease upon DEAE-substitution, especially in the case of the more substituted derivatives, an indication that main chain degradation took place during the

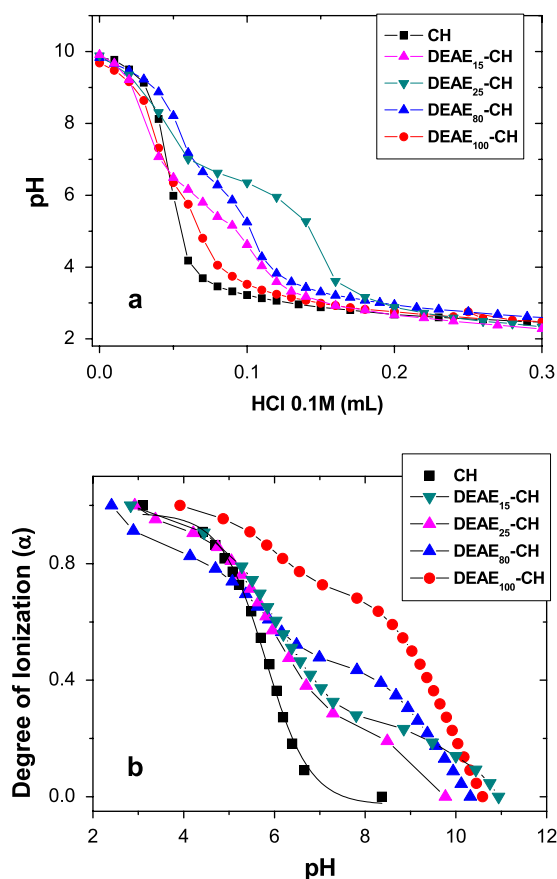


Figure 3. (a) Buffering capacity and (b) degree of ionization of CH and DEAE-CH derivatives as a function of pH. Determined from potentiometric and conductimetric titrations.

reaction of CH (figure S4 available at stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia). However, as can be seen from table 1, the intrinsic viscosities were not greatly affected in view of the increase in the average molecular weight of the monomer units upon DEAE-substitution.

3.2. Buffer capacity and ionization degree (α) of the chitosan derivatives

It has been proposed that the intracellular release of DNA from nanoparticles may be increased by providing higher buffering capacities to the polycations, which in turn may improve the escape from endosomes by the mechanism known as proton sponge [25, 26]. The buffering capacities of the DEAE-CH derivatives were determined by the acid-base titration method [12]. By this method the derivatives having high buffering capacities would undergo small changes in pH when the same amount of HCl was added into the derivative solutions. From the figure 3(a), it can be seen that the buffering capacity increased from CH to DEAE₂₅-CH and the latter one exhibited the higher buffering capacity. Figure 3(a) allows estimating the amount of acid needed to decrease the pH from 7.4 to 5.0. These calculations show that CH, DEAE₁₅-CH, DEAE₂₅-CH, DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH can bind respectively 0.61, 2.81, 4.50, 2.27 and 1.41 mMol of H^+ per gram of polycation. For DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH,

the buffering capacity decreased when compared to both DEAE₁₅-CH and DEAE₂₅-CH, and this behavior might be due to the partial quaternization of the tertiary amino groups. Therefore the buffering capacity for the more substituted derivatives (DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH) decreased due to the higher number of protonated amino groups at physiological pH 7.4.

The increasing DS provides more amino groups on the polymer chain, which in turn increases α . The ionization degrees for CH and the DEAE-CH derivatives were estimated by taking into account the results obtained from conductimetric and potentiometric titrations, which were carried out to monitor the pH and the onset and ending of the deprotonation during the titration of the amino groups. As can be seen from figure 3(b), at low pH (4–5) the ionization degree (α) for CH is near to 1.0 and decreases in a sigmoid pattern as pH increases; at pH 7.0 the ionization degree is near to zero. For the DEAE-CH derivatives, the sigmoid curves were gradually displaced to higher pH ranges as the degree of substitution (DS) was increased. At pH 7.4 the degrees of ionization for CH, DEAE₁₅-CH and DEAE₁₀₀-CH are, respectively, zero, 0.3 and to 0.7 for the more substituted derivative. The increasing ionization degrees reinforce the interaction between the pDNA and the DEAE-CH derivatives affecting the pDNA-DEAE-CH interaction. The effect of pH, and accordingly α , bring insights about the strength of interaction, the sizes and zeta potential of the nanoparticles and their colloidal stability. These parameters affect the transfection efficiencies and are evaluated and discussed in the following sections.

3.3. Interaction of CH and DEAE-CH with pDNA

3.3.1. Ethidium bromide assay. The interaction of CH and DEAE-CH derivatives with the pDNA was monitored by a fluorescence quenching technique using the cationic dye ethidium bromide (EtBr). Titrations of pDNA-EtBr complex with solutions of chitosan and its DEAE derivatives were conducted at pH 5.0 and 7.4. The result of this assay is shown in figure 4, where it can be seen that the addition of CH and DEAE-CH to aqueous solutions of pDNA-EtBr complexes resulted in a pronounced decrease of fluorescence intensity due to the competitive displacement of EtBr by the polycations. All titration curves are presented as a function of the overall N content of the DEAE-substituted and unsubstituted amino groups. A decrease of EtBr fluorescence was observed for all mixtures, indicating that DNA-chitosan complexes form at both pH values.

The quenching was more pronounced for solutions of lower pH and at pH = 5.0 the addition of CH had the higher efficiency. The leveling off of the EtBr fluorescence occurred for 30% of the initial fluorescence, when the charge ratio was close to 2 (figure 4). It is worth noting that DEAE₁₅-CH at pH 5.0 had almost the same quenching efficiency as was observed for CH, however, the higher substituted chitosans DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH exhibited, respectively, quenching efficiencies 2.0 and 2.5 times lower than that obtained with CH. This behavior could

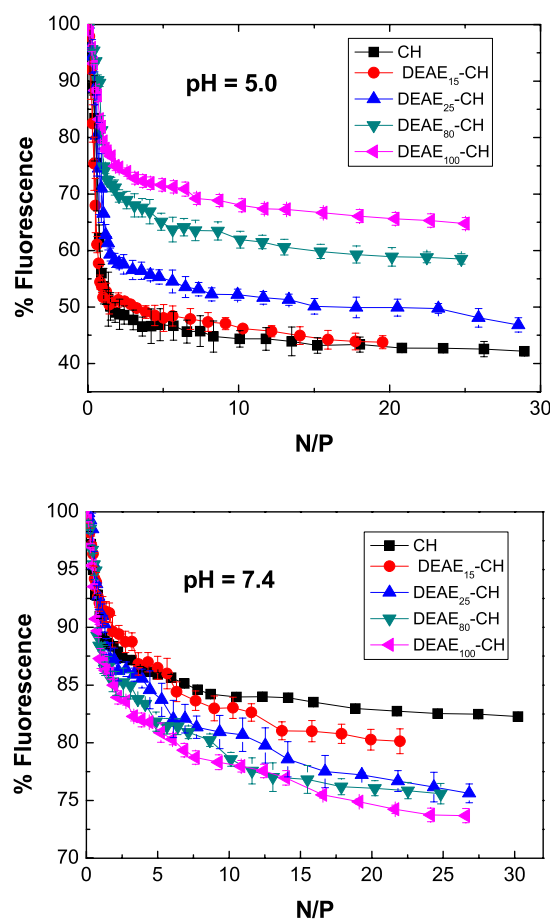


Figure 4. Titration of pDNA-EtBr solution by deacetylated chitosan and DEAE-CH with different fractions of diethylamine units (DEAE) at different pH values ((a), (b)). The fluorescence intensity relative to the fluorescence of pDNA-EtBr in the absence of polycation is plotted as a function of nitrogen/phosphate (N/P) ratio. Data points represent the mean (SD (n 3)). The following buffers were used: (a) HAc/NaAc pH 5.0, (b) phosphate pH 7.4.

indicate a weaker interaction between these derivatives and the pDNA. However, a possible explanation for these results is that as the quenching efficiency is due to displacement of EtBr to the aqueous media, more branched chains may hinder the closer interaction with pDNA and EtBr may eventually be retained inside the complexes.

Increasing the pH from 5.0 to 7.4 resulted in minor changes in EtBr fluorescence. For CH at pH 7.4 a level of 85% was reached only at N/P ratio 8.0, which reflects the low degree of ionization of chitosan at this pH. All substituted chitosans shift towards lower fluorescence levels, however, at pH 7.4 the ionization degrees (α) for DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH are respectively 0.46 and 0.70, which leads to stronger interactions of the pDNA with these two polymers compared to CH, whose α is near to zero (figure 4(b)). These results were confirmed by electrophoresis results discussed in section 3.3.2.

3.3.2. Gel electrophoresis. The stability of the complexes formed between the pDNA and CH and its DEAE derivatives

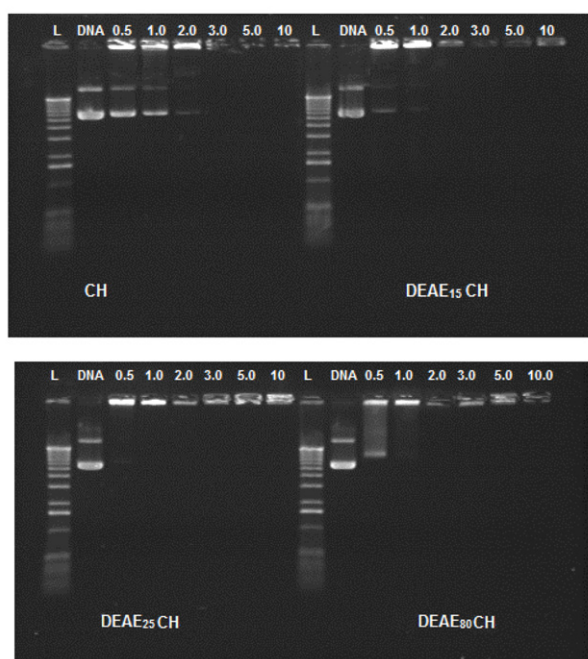


Figure 5. Electrophoresis of chitosan–pDNA nanoparticles to determine physical stability of chitosan-based polyplexes in gel retardation assay at pH 5.0. The N/P ratios are indicated on top of the lanes.

was assessed by gel electrophoresis (figure 5). Uncomplexed pDNA (VR 1412) was loaded in the first lane on the left, while pDNA–CH and pDNA–DEAE_x–CH nanoparticles prepared at pH 5.0 with CH and DEAE_x–CH derivatives using increasing N/P ratios were loaded in the other lanes. Nanoparticles formed at pH 5.0 with non-modified CH exhibited no DNA release when the N/P ratios were higher than 2.0. However, nanoparticles prepared with all derivatives showed no pDNA release at N/P ratio 1.0. The tendency to release DNA by DEAE_xCH is lower than that observed for CH and decreased for nanoparticles prepared with the most substituted derivatives. For DEAE₈₀–CH and DEAE₁₀₀–CH, no pDNA release was observed at N/P ratios higher than 0.5, indicating a strong attachment of the pDNA to these derivatives. Following digestion with chitosanase and lysozyme, the plasmid DNA was released from the chitosan derivatives, the plasmid remained intact and did not show any signs of degradation (figure S5 available at stacks.iop.org/Nano/24/055101/mmedia). This suggests that the synthesis conditions utilized did not affect the integrity of the condensed DNA.

3.3.3. Light scattering and zeta potential measurements.

Size and zeta potential of nanoparticles are recognized as being very important parameters for the success of transfection processes. Measurements were taken at two pH values, pH 5.0 and 7.4, aiming to evaluate if particles sizes and zeta potentials when subjected to pH 7.4 would significantly change the properties of the nanoparticles, i.e., to evaluate how physiological pH would affect the sizes and zeta potentials. As can be seen from figure 6, at pH 5.0

and N/P ratios higher than 2.0, all derivatives were able to compact the pDNA into nanoparticles whose sizes were around 150–200 nm. As indicated in figure 6(b), the surface charge of the nanoparticles increased, reaching a plateau around +20 mV for N/P ratios higher than 2.0. At this pH all amino groups are charged and it would be expected that zeta potentials be positive for all derivatives. As can be seen in figure 3 the ionization degree for CH and their DEAE derivatives is near 1.0, therefore the colloidal stability of these nanoparticles is provided by the excess of polycations.

At pH 7.4 the sizes for nanoparticles prepared with deacetylated chitosan (CH) remained around 400 nm, and decreased to around 200 nm only at N/P ratio 10. In general, it has been shown that, near to pH 7.0, the interaction of deacetylated chitosans with pDNA leads to formation of nanoparticles whose sizes can vary from 200 to 1000 nm, depending on the medium and ionic strength [4, 27, 28]. However, nanoparticle sizes around 200–400 nm have been obtained using chitosans with varied molecular weights, and if Mw is higher than 10 kDa then no significant size dependence was observed regarding the Mw, pH and N/P ratio utilized [17]. The increase of pH or ionic strength of the medium may result in nanoparticles having low zeta potentials, which may aggregate without affecting the transfection efficiencies [29]. Interestingly, the sizes of the nanoparticles prepared with DEAE derivatives decreased to around 200 nm at lower N/P ratios, for instance, at N/P 2.0 nanoparticle sizes for the DEAE₂₅–CH derivative were around 170 nm (figure 6(b)). Moreover, nanoparticle sizes remained constant during the period of 30 min after their preparation. These smaller nanoparticles obtained with DEAE–CH derivatives can be attributed to the higher charge density on the polymer chain, which provides a stronger interaction with pDNA, leading to formation of nanoparticles exhibiting more positive zeta potentials. At pH 7.4, the polymer chains remain partially charged and, for nanoparticles prepared with deacetylated chitosan (CH), the charge surface stabilizes at N/P ratio 5.0 at a value of +3.0 mV, while for DEAE₁₅–CH, DEAE₂₅–CH, DEAE₈₀–CH and DEAE₁₀₀–CH the zeta potential values reached the leveling off respectively at +5, +9, +12 and +15 mV. This can be explained on the basis of the degrees of ionization at pH 7.4, which increase with DS due to the higher pKa values for secondary and tertiary amino groups. Zeta potential is an important parameter and, although transfection efficiency cannot be always correlated with the size and surface charge of the nanoparticles [29], it has been reported that charge density and molecular weight play an important role in compaction and transfection efficiency [30–32]. Therefore, at pH 7.4 the nanoparticles using the DEAE–CH derivatives retain positive zeta potentials, which contribute towards increasing the interaction with the cell surface, favoring the uptake process.

3.3.4. *In vitro* transfection efficiency. The *in vitro* transfection was performed on HeLa cells aimed at evaluating the effect of DEAE groups on transfection efficiency. As shown in figure 4, the increasing degrees of substitution (DS)

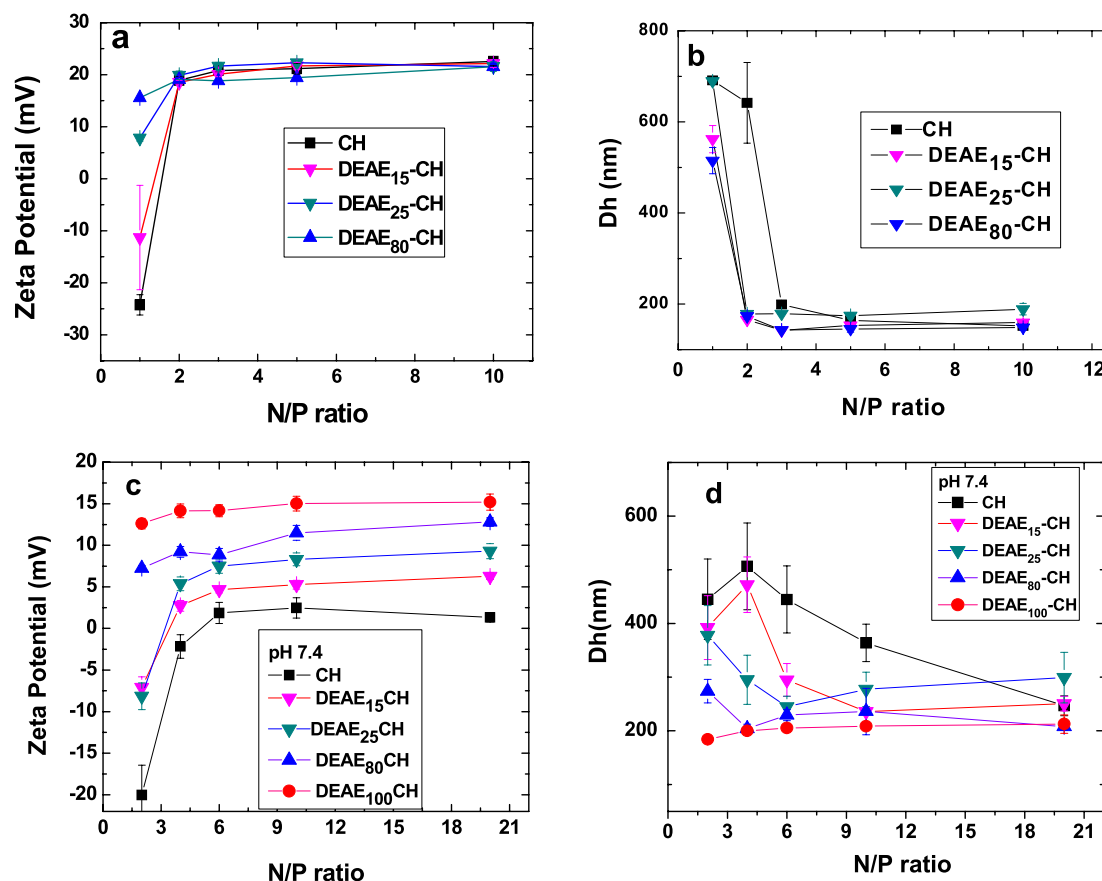


Figure 6. Zeta potential and nanoparticle sizes of DEAE_x-CH/pDNA complexes at ((a), (b)) pH 5.0 and ((c), (d)) pH 7.4. (mean \pm SD, $n = 3$).

provided higher ionization degrees at neutral pH and enhanced buffering capacities of the derivatives, which may affect the nanoparticle interactions with the cell surface and their uptake and delivery of the pDNA inside the cytosol. Hella cells were subjected to transfection protocol at N/P ratios varying from 1.0 to 10 and the results are shown in figure 7. The gene expression strongly depends on the structure of the polymers. The nanoparticles prepared with deacetylated chitosan CH, increased greatly (100 \times) from N/P ratio 1.0 to 2.0–3.0, then decreased again to higher N/P ratios. This result correlates well with both the agarose gel retardation assay and the zeta potential measurements. As shown in figure 7, the transfection efficiency of nanoparticles prepared with CH reached a maximum at N/P ratio 2–3, when zeta potentials were slightly positive (+4 mV). As can be seen from figure 5, at these ratios the pDNA was completely retained in the electrophoresis experiment. However, at higher N/P ratios (N/P = 5, 10), nanoparticle sizes were smaller in the range studied, and the transfection efficiency suddenly decreased, which indicates that, although interaction with cells may be favored in the presence of an excess of polycation, the delivery of pDNA inside the cytosol is decreased. Recent studies showed that the excess of chitosan is fundamental to increase the transfection efficiency [33] and that the gene delivery is controlled by the binding strength between chitosan and pDNA [29]. It is believed that above the optimum levels, the

expression of transgene reduces, indicating that the polyplexes are excessively stable [29]. This could explain the decreased transfection efficiency mediated by chitosan for N/P ratios higher than 3.0.

The same pattern was also observed for DEAE-CH derivatives, however, transfection efficiency for DEAE₁₅-CH and DEAE₂₅-CH were about ten times higher than that observed for deacetylated chitosan (CH). This result can be attributed to the higher buffering capacities at pH range 7.4–5.0 and higher ionization degrees at pH 7.4, which in turn provide an improved cellular uptake and delivery. Nanoparticles prepared with the most substituted derivatives, DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH, exhibited transfection efficiencies lower than those obtained with DEAE₁₅-CH and DEAE₂₅-CH and were similar to that obtained with deacetylated chitosan (CH). This result can be rationalized by taking into account α , the strength of interaction, and the cytotoxicity of derivatives. Derivatives having high degrees of substitution (DEAE₈₀-CH and DEAE₁₀₀-CH) possess at pH 7.4 higher α values (0.4–0.7), their smaller sized nanoparticles and more positive zeta potentials (+10–15 mV) are properties that would favor a higher cellular uptake, but this step is not considered a bottleneck in the process [33]. The transfection efficiencies for nanoparticles prepared with these two derivatives remained comparable to that of deacetylated chitosan in the studied N/P range. Therefore, it must

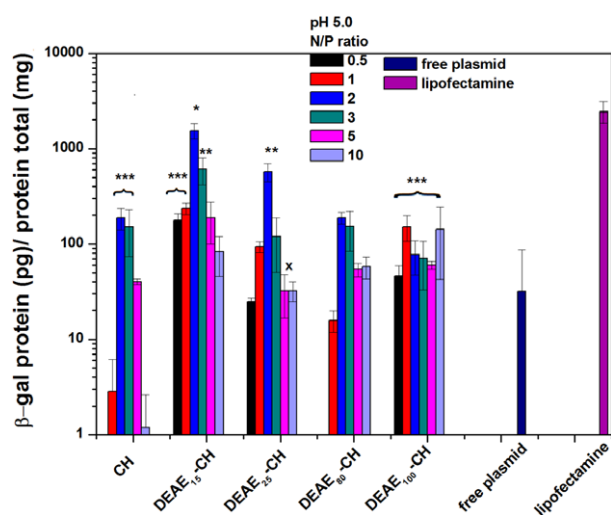


Figure 7. Transfection efficiency of chitosan–DNA nanoparticles incubated with Hela cells, in the presence of 10% serum. Cells received either 5.0 μg of naked DNA or nanoparticles of chitosan and its DEAE derivatives containing 5.0 μg of DNA. The results were normalized compared to the control (100%). * Bars sharing symbols are not significantly different ($p < 0.05$).

be considered that the decreased transfection efficiencies observed for DEAE₈₀–CH and DEAE₁₀₀–CH might be due to both the high strength of interaction with the pDNA and the lower buffering capacities of these two derivatives (figure 3(a)). This interpretation is partially supported by EtBr assay at pH 7.4 (figure 5), where it can be seen that the pDNA binds to DEAE₈₀–CH and DEAE₁₀₀–CH more efficiently than to both CH and the less substituted derivatives.

3.3.5. Cytotoxicity of the nanoparticles. The cytotoxicities of the nanoparticles are shown in figure 8 for increasing N/P ratios, and the results follow the same pattern as the transfection efficiency, since for the N/P ratios >4.0 the cells viability decreases abruptly, particularly for DEAE₈₀–CH and DEAE₁₀₀–CH. Moreover, the cytotoxicity increased with DS and, as can be seen from figure 8, even at N/P ratio 2.0, nanoparticles prepared with DEAE₁₀₀–CH decreased the cell viability to around 60%. Therefore, the lower transfection efficiency for these derivatives is also related to low cell viability, since the excess of polycation and the binding of the nonbound polycation to the cell surface may increase the cytotoxicity, contributing to decrease the number of transfected cells.

4. Conclusions

Chitosans grafted with tertiary and secondary amino groups can be synthesized through reaction with diethylethylamine chloride. The resulting polymers have varied ionization degrees at physiological pH. The control of the degree of grafting provides amino groups with higher pK_a values, which affect the buffering capacities of chitosan, the nanoparticles properties and consequently the transfection efficiencies. Derivatives having lower DS (15–25%) lead

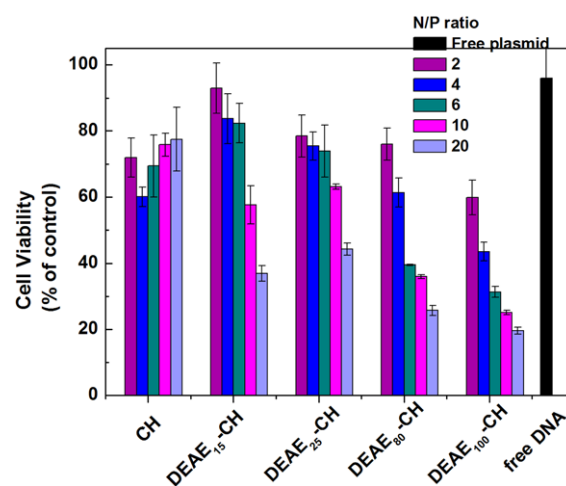


Figure 8. Cellular toxicity on HeLa cells incubated with either 5.0 μg of naked DNA, or with nanoparticles composed with CH and DEAE_x–CH derivatives containing an equivalent amount of 5.0 μg of DNA. LipofectAMINE™ 2000 reagent was used for comparison. Cell viability is measured with the MTS assay and compared to nontreated cells, which are considered as 100%.

to formation of nanoparticles with slightly positive zeta potentials at physiological pH and mediated transfection efficiencies ten times higher than deacetylated chitosan. For the most grafted derivatives, the needed charge ratio to accomplish the pDNA binding decreased, but cytotoxicity increases due to an excess of highly charged chains. The derivatives having the higher DS interact more strongly with pDNA at physiological pH, the control of DS together the molecular weight opens up new possibilities to maximize the efficiency of the systems. Therefore this study reveals how buffering capacity and charge density affect the *in vitro* gene expression and establishes, as an important variable, the ionization degree of polycations at physiological pH, to optimize future nanoparticle formulations. Moreover, these cationic DEAE–chitosan nanoparticles could enhance gene transfection *in vitro* and have the potential to be a promising non-viral delivery system.

Acknowledgments

This work was supported by a grant (2011/18692-0) from Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) to MJT, by a PhD scholarship from the Fapesp to IPDP (2010/09651-6) and the Canadian Institutes of Health Research (CCM 104888). We thank David R M Mercer for English revision.

References

- [1] Duceppe N and Tabrizian M 2010 *Exp. Opin. Drug Deliv.* **7** 1191–207
- [2] Jayakumar R, Chennazhi K P, Muzzarelli R A A, Tamura H, Nair S V and Selvamurugan N 2010 *Carbohydr. Polym.* **79** 1–8
- [3] Tiera M J, Shi Q, Winnik F M and Fernandes J C 2011 *Curr. Gene Ther.* **11** 288–306

- [4] Nimesh S, Thibault M M, Lavertu M and Buschmann M D 2010 *Mol. Biotechnol.* **46** 182–96
- [5] Gao Y, Xu Z, Chen S, Gu W, Chen L and Li Y 2008 *Int. J. Pharmac.* **359** 241–6
- [6] Convertine A J, Diab C, Prieve M, Paschal A, Hoffman A S, Johnson P H and Stayton P S 2010 *Biomacromolecules* **11** 2904–11
- [7] Alatorre-Meda M, Taboada P, Hartl F, Wagner T, Freis M and Rodríguez J R 2011 *Colloids Surf. B* **82** 54–62
- [8] Sun B, Zhao R, Kong F, Ren Y, Zuo A, Liang D and Zhang J 2010 *Int. J. Pharmac.* **397** 206–10
- [9] Chang K-L, Higuchi Y, Kawakami S, Yamashita F and Hashida M 2010 *Bioconjug. Chem.* **21** 1087–95
- [10] Ping Y, Liu C-D, Tang G-P, Li J-S, Li J, Yang W-T and Xu F-J 2010 *Adv. Funct. Mater.* **20** 3106–16
- [11] Gao Y, Zhang Z, Chen L, Gu W and Li Y 2009 *Biomacromolecules* **10** 2175–82
- [12] Lu B, Xu X D, Zhang X Z, Cheng S X and Zhuo R X 2008 *Biomacromolecules* **9** 2594–600
- [13] Pezzoli D, Olimpieri F, Malloggi C, Bertini S, Volonterio A and Candiani G 2012 *PLoS One* **7** e34711
- [14] Gao J Q, Zhao Q Q, Lv T F, Shuai W P, Zhou J, Tang G P, Liang W Q, Tabata Y and Hu Y L 2010 *Int. J. Pharmac.* **387** 286–94
- [15] Kiang T, Wen J, Lim H W and Leong K W 2004 *Biomaterials* **25** 5293–301
- [16] de la Fuente M, Seijo B and Alonso M J 2008 *Nanotechnology* **19** 75105–14
- [17] Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N and Buschmann M D 2006 *Biomaterials* **27** 4815–24
- [18] Strand S P, Issa M M, Christensen B E, Vårum K M and Artursson P 2008 *Biomacromolecules* **9** 3268–76
- [19] Gao Y, Zhang Z, Chen L, Gu W and Li Y 2009 *Biomacromolecules* **10** 2175–82
- [20] Kean T, Roth S and Thanou M 2005 *J. Control Release* **103** 643–53
- [21] Bhise N S, Gray R S, Sunshine J C, Htet S, Ewald A J and Green J J 2010 *Biomaterials* **31** 8088–96
- [22] Casé A H, Dalla Picola I P, Zaniquelli M E, Fernandes J C, Taboga S R, Winnik F M and Tiera M J 2009 *J. Colloids Interface Sci.* **336** 125–33
- [23] Tiera M J, Qiu X P, Bechaouch S, Shi Q, Fernandes J C and Winnik F M 2006 *Biomacromolecules* **7** 3151–6
- [24] Brugnerotto J, Desbrières J, Roberts G and Rinaudo M 2001 *Polymer* **42** 9921–7
- [25] Akinc A, Thomas M, Klibanov A M and Langer R 2005 *J. Gene Med.* **7** 657–63
- [26] Funhoff A M, van Nostrum C F, Koning G A, Schuurmans-Nieuwenbroek N M E, Crommelin D J A and Hennink W E 2004 *Biomacromolecules* **5** 32–9
- [27] Picola I P D, Busson K A N, Casé A H, Nasário F D, Tiera V A O, Taboga S R, Neto J R and Tiera M J 2012 *J. Exp. Nanosci.* at press
- [28] Fernandes J C, Wang H J, Benderdour M, Qiu X P, Winnik F M, Zhang X L, Dai K R and Shi Q 2008 *Mol. Ther.* **16** 1243–51
- [29] Strand S P, Lelu S, Reitan N K, Davies C L, Artursson P and Vårum K M 2010 *Biomaterials* **31** 975–87
- [30] Ren Y, Jiang X, Pan D and Mao H-Q 2010 *Biomacromolecules* **11** 3432–9
- [31] Maurstad G, Danielsen S and Stokke B T 2007 *Biomacromolecules* **8** 1124–30
- [32] Klausner E A, Zhang Z, Chapman R L, Multack R F and Volin M V 2010 *Biomaterials* **31** 1814–20
- [33] Thibault M, Astol M, Tran-Khanh N, Lavertu M, Darras V, Merzouki A and Buschmann M D 2011 *Biomaterials* **32** 4639–46
- [34] Douglas K L, Piccirillo C A and Tabrizian M 2006 *J. Control Release* **115** 354–61

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 30/09/2013


Assinatura