

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/04/2021.



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

**André Miguel Martinez Junior**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA  
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO  
SILENCIAMENTO DE TNF- $\alpha$**

São José do Rio Preto

2019

**André Miguel Martinez Junior**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA  
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO  
SILENCIAMENTO DE TNF- $\alpha$**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

Co-orientador: Dr. Maicon Segalla Petrônio

São José do Rio Preto

2019

M385s                      Martinez Junior, André Miguel

                                 Síntese e caracterização de nanopartículas bioresponsivas para liberação de RNA de interferência : estudo in vitro do silenciamento de TNF-a / André Miguel Martinez Junior. -- São José do Rio Preto, 2019

                                 130 f. : il., tabs.

                                 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

                                 Orientador: Marcio José Tiera

                                 Coorientador: Maicon Segalla Petrônio

                                 1. Química. 2. Terapia genética. 3. Materiais nanoestruturados. 4. Biopolímeros. 5. Quitosana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**André Miguel Martinez Junior**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA  
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO  
SILENCIAMENTO DE TNF- $\alpha$**

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

Financiadora: CAPES

**BANCA EXAMINADORA**

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

Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro  
USP – São Carlos

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Simone Leite Vilamaior  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

30 de abril de 2019

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir minha graduação nesta excelente universidade e agora por me guiar na carreira acadêmica.

Aos meus pais, André e Eliana, por me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao Prof. Dr. Marcio J. Tiera pela orientação, ensinamentos e confiança desde a iniciação científica. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera A. O. Tiera pelos ensinamentos, ajuda no desenvolvimento dos experimentos e na aquisição dos materiais.

Aos meus amigos, membros do grupo, pela amizade, ensinamentos e companheirismo. Ao meu co-orientador Maicon S. Petrônio pela amizade, ensinamentos e pelo direcionamento que deveras contribuíram para realização desse trabalho. Agradeço por tornarem essa jornada mais alegre e gratificante.

A todos os professores, técnicos e amigos que ajudaram na execução dos experimentos e na análise dos resultados. Em especial, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia dos S. P. Cabrera, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia R. B. Domingos e ao prof. Dr. Marcelo de F. Lima pela ajuda e acesso à instrumentação. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia S. L. Vilamaior e à MSc. Grazieli O. Martins pela ajuda, disponibilidade e obtenção das imagens de microscopia confocal. Ao Dr. Fábio. R. de Moraes pela ajuda com as análises de RMN C<sup>13</sup> e à Dr.<sup>a</sup> Sylvana. C. M. Agostinho e ao MSc. André. L. Tognon pela disponibilidade em realizar as medidas de RMN H<sup>1</sup>. À Dr.<sup>a</sup> Aline M. F. Lima e ao Luiz F. de M. Ferraz pela obtenção das análises de microscopia eletrônica de varredura.

A UNESP/IBILCE e a todos os professores por possibilitarem minha formação acadêmica e contribuírem para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Gustavo Bonilla e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iêda P. Fertoni que deram contribuições muito bem vindas na qualificação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Aos membros da banca examinadora que se disponibilizaram em avaliar e contribuir para melhoria deste trabalho.

Agradeço a todos que estiveram presentes e me apoiaram ao longo do mestrado.

Muito obrigado!

## RESUMO

O desenvolvimento tecnológico na síntese de ácidos nucleicos, possibilitou a obtenção de siRNAs com alta especificidade, aumentando o potencial de aplicação dessas moléculas na terapia gênica não viral. Contudo, a preparação de carreadores seguros e eficientes para entrega de siRNA é, ainda, um desafio que tem limitado suas aplicações terapêuticas. Neste estudo, foram sintetizados polímeros multifuncionais baseados em quitosana para serem aplicados como carreadores na terapia gênica não viral. Polímeros com diferentes massas moleculares e proporções crescentes de diisopropiletilamina (DIPEA), dietilaminoetil (DEAE) e polietilenoglicol (PEG) foram sintetizados e caracterizados. Os graus de substituição por DIPEA (5 – 55%), DEAE (15 – 57%) e PEG (1,8 – 2,5%) foram determinados por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . Modificações regioseletivas na hidroxila (C-6) da quitosana foram realizadas por meio da proteção dos grupos amina com anidrido ftálico, seguida pela substituição (DIPEA) e desbloqueio com hidróxido de sódio. O grau de ionização dos diferentes polímeros foi estudado em função do pH e os resultados mostraram que a carga superficial pode ser controlada por alterações na composição dos polímeros. Os derivados apresentaram capacidade de tamponamento superiores às quitosanas não modificadas. As nanopartículas foram preparadas por simples complexação e apresentaram diâmetro hidrodinâmico entre 100 e 200 nm, com potencial zeta positivo a partir da razão de amino/fosfato (N/P) 3. O potencial zeta mostrou-se dependente do conteúdo de DIPEA e PEG nos polímeros, bem como da razão N/P. O estudo de eletroforese indicou que os derivados de quitosana interagem fortemente com o siRNA, sob baixas razões N/P. A estabilidade coloidal e biológica das nanopartículas sob condições fisiológicas (pH 7,4 e força iônica de  $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi melhorada por meio do ajuste do grau de substituição (DIPEA e PEG), e nanopartículas com 200 nm permaneceram estáveis até 24 horas após sua preparação, e em até 7 horas na presença da albumina sérica bovina (BSA). A microscopia eletrônica de varredura mostrou nanopartículas com morfologia esférica. Estudos de citotoxicidade mostraram viabilidade celular superior a 70% para todos os polímeros e superior a 75% para todos os políplexos até a razão N/P 10. A microscopia confocal e os estudos de transfecção *in vitro* por meio do silenciamento de TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7, mostraram internalização eficiente do siRNA e um bloqueio de até 60% na expressão de TNF- $\alpha$ . Em geral os resultados apresentados, indicam que esses derivados são vetores promissores para transfecção *in vivo*.

**Palavras-chave:** Quitosana, siRNA, políplexos, terapia gênica, vetor não viral.

## ABSTRACT

The technological development of synthetic nucleic acids has allowed to obtain siRNAs with high specificity, increasing the potential of these molecules for applications in the field of the non-viral gene therapy. However, the preparation of safe and efficient carriers for the siRNA delivery remains as a challenge that has limited the therapeutic applications. In this study, multifunctional polycations based on chitosan were synthesized for application as carriers for non-viral gene therapy. Polycations with different molecular weights and grafted with increasing proportions of diisopropylethylamine (DIPEA), diethylaminoethyl (DEAE) and polyethylene glycol (PEG) groups were synthesized and characterized. The degrees of substitution by DIPEA (5 - 55%), DEAE (16 - 57%) and PEG (1.8 - 2.5%) were determined by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR. The regioselective modification on the hydroxyl groups (C-6) of chitosan, was accomplished by the protection of the amino groups with phthalic anhydride, followed of substitution (DIPEA) and unlocking with sodium hydroxide. The ionization degrees of the different polycations were studied as a function of pH and the results showed the surface charge can be adjusted by varying the polymer composition. Derivatives demonstrated improved buffering capacity compared to unmodified chitosan. Nanoparticles were prepared by the simple complexation and showed hydrodynamic diameters in the range of 100-200 nm, with positive zeta potentials for amine/phosphate (N/P) ratios higher than 3. The results from zeta potential measurements showed that this parameter depends on the contents of DIPEA and PEG content and on the N/P ratio used. The electrophoretic studies pointed out that, at low N/P ratios siRNA interacted strongly with the polymers. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements showed that the colloidal stability of the nanoparticles under physiological conditions (pH 7.4 and ionic strength of 150 mmol L<sup>-1</sup>) was improved by adjusting the degrees of substitution (DIPEA e PEG), and nanoparticles with 200 nm remained stable up to 24 hours after their preparation and up to 7 hours in the presence of bovine serum albumin (BSA). The scanning electron microscopy displayed nanoparticles with a spherical morphology. The cytotoxicity studies showed that cell viabilities were higher than 70% for all polymers and higher than 75% for all nanoparticles up to the N/P 10. Confocal microscopy and transfection study by mean of the TNF- $\alpha$  knockdown in RAW 264.7 macrophages presented a good efficiency for internalization of siRNA and reduction up to 60% in TNF- $\alpha$  expression. Overall, the results showed that these derivatives are promising vectors for *in vivo* application.

**Keywords:** Chitosan, siRNA, polyplexes, gene therapy, non-viral vector.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais estágios da entrega de ácidos nucleicos usando vetores nanoestruturados, desde (a) a distribuição e permeação pelos tecidos até (b) a captação, escape endossomal e silenciamento genético via RNA de interferência (siRNA).....	21
Figura 2 – Estrutura química da cloroquina e de alguns importantes polímeros aplicados na terapia gênica .....	26
Figura 3 – (a) Representação esquemática da preparação das nanopartículas via método de simples complexação e (b) os mecanismos envolvidos na distribuição e na liberação bioestimulada (via ação da glutatona intracelular) das nanopartículas .....	32
Figura 4 – Componentes estruturais das principais unidades dos polications em estudo, com indicativo das principais funções .....	33
Figura 5 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados das séries I e II com indicação da lógica adotada em suas nomenclaturas.....	37
Figura 6 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série III com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura .....	37
Figura 7 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série IV com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura .....	41
Figura 8 – Esquema para reação de desacetilação .....	55
Figura 9 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H da CM comercial e CM (em DCl/D <sub>2</sub> O).....	56
Figura 10 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da CH (em DCl/D <sub>2</sub> O).....	56
Figura 11 – Esquema da reação de substituição com DIPEA e indicação das principais estruturas obtidas .....	57
Figura 12 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados de média massa molecular (em DCl/D <sub>2</sub> O) .....	59
Figura 13 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados de alta massa molecular (em DCl/D <sub>2</sub> O) .....	60
Figura 14 – Esquema da reação de substituição com DEAE e indicação das principais estruturas obtidas .....	61
Figura 15 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados da série III (em DCl/D <sub>2</sub> O) .....	62
Figura 16 – Esquema da reação de peguilação com ativação por SPDP.....	63
Figura 17 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados da série I ((DIPEA de média massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em DCl/D <sub>2</sub> O) .....	64
Figura 18 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados da série II (DIPEA de alta massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em DCl/D <sub>2</sub> O) .....	65

Figura 19 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado da série III (DEAE e amina quaternária) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em DCI/D <sub>2</sub> O).....	66
Figura 20 – Espectros de RMN <sup>13</sup> C dos polímeros de média massa molecular (em DCI/D <sub>2</sub> O).....	68
Figura 21 – Espectros de RMN <sup>13</sup> C dos polímeros de alta massa molecular (em DCI/D <sub>2</sub> O).....	69
Figura 22 – Esquema da reação de marcação com isotiocianato de rodamina B.....	70
Figura 23 – (a) Curva analítica com isotiocianato de rodamina B (RITC) e (b) espectros de absorvância do CMD34 e CMD34-RITC .....	70
Figura 24 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da C (DCI/D <sub>2</sub> O).....	71
Figura 25 – Esquema da reação de bloqueio dos grupos amina da quitosana.....	72
Figura 26 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da B-C (DMSO-d <sub>6</sub> /DCI) .....	72
Figura 27 – Esquema da reação de substituição com DIPEA nos polímeros bloqueados .....	73
Figura 28 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados bloqueados substituídos com DIPEA (DMSO-d <sub>6</sub> /DCI).74	
Figura 29 – Esquema da reação de desbloqueio.....	75
Figura 30 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados desbloqueados (DMSO-d <sub>6</sub> /DCI) .....	76
Figura 31 – Capacidade de tamponamento dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV).....	81
Figura 32 – Grau de ionização dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV) em função do pH. As entradas em (a) e (b) são fotografias dos polímeros (2 g L <sup>-1</sup> ) dispersos em tampão fosfato pH 7,4 (I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> ).....	83
Figura 33 – Eletroforese dos políplexos formados pelos polímeros substituídos com DIPEA das séries (a) I e (b) II em diferentes razões N/P no pH 7,4 (I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> ).....	85
Figura 34 – Eletroforese dos políplexos formados pelos polímeros das séries (a) III e (b) IV em diferentes razões N/P no pH 7,4 (I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> ).....	86
Figura 35 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de média massa molecular substituídos com DIPEA (série I) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ) .....	89
Figura 36 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de alta massa molecular substituídos com DIPEA (série II) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ) .....	90
Figura 37 – (direita) Diâmetro hidrodinâmico e (esquerda) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de (a, b) média e (c, d) alta massa molecular substituídos com DIPEA em função do tempo. Todas	

as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ) .....	93
Figura 38 – Distribuições representativas do diâmetro hidrodinâmico (baseado na intensidade de luz espalhada) das nanopartículas na presença de albumina sérica bovina (BSA; 40 g L <sup>-1</sup> ) em função do tempo. Todas as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ).....	94
Figura 39 – Imagens representativas de MEV-FEG e das nanopartículas do CMD55-P <sub>1,3</sub> preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> .....	95
Figura 40 – Viabilidade celular de (a, b) fibroblastos 3T3/NIH e (c) macrófagos RAW 264.7 na presença dos polímeros de média massa molecular com DIPEA/PEG (série I) .....	97
Figura 41 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros de alta massa molecular com DIPEA/PEG (série II).....	98
Figura 42 – Viabilidade celular de (a) fibroblastos 3T3/NIH e (b) macrófagos RAW 264.7 na presença de poliplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de média massa molecular (série I) em diferentes razões N/P preparados em pH 7,4 e I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> .....	99
Figura 43 – Viabilidade celular dos poliplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de alta massa molecular (série II) em diferentes razões N/P, realizada em fibroblastos 3T3/NIH .....	100
Figura 44 – Microscopia confocal dos macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas de CMD34-RITC/siRNA-FAM preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> .....	101
Figura 45 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- $\alpha$ por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série I com siRNA anti-TNF- $\alpha$ em diferentes razões N/P, na ausência e na presença de FBS. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ). .....	103
Figura 46 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- $\alpha$ por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série II com siRNA anti-TNF- $\alpha$ em diferentes razões N/P. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L <sup>-1</sup> ) .....	104
Figura A1 – Estrutura e massa molar (mm) dos principais meros em estudo .....	114
Figura B1 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de um derivado da série III, com indicação das áreas consideradas para o desenvolvimento da Equação 1 .....	116
Figura C1 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos derivados de alta massa molecular com PEG com integração dos carbonos metílicos do DIPEA (H-DIPEA) .....	119
Figura C2 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H da CM e CM-P <sub>1,6</sub> .....	120
Figura C3 – Eletroforese dos poliplexos formados pela CM e CM-P <sub>1,6</sub> (em tampão fosfato pH 7,4) .....	120

Figura D1 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas CM, DMD15, CMD55, CMD <sub>E</sub> 16 e CMD <sub>E</sub> 57 .....	121
Figura D2 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas da (esquerda) CMD5 e CMD34 e (direita) CHD16, CHD32 e C*(Sigma-Aldrich).....	122
Figura E1 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de média massa molecular (série I ) .....	123
Figura E2 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de alta massa molecular (série II) .....	125
Figura E3 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros com DEAE (série III) .....	126
Figura E4 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros da série IV (bloqueio e DIPEA)	127
Figura F1 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros com DEAE (série III) .....	129
Figura F2 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos políplexos formados pelo O-CD68 (com siRNA anti-TNF- $\alpha$ ) em diferentes razões N/P no 7,4 (I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> , Conc. fosfato = 0,05 mol L <sup>-1</sup> ).....	129
Figura G1 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos políplexos formados pelo CMD34 (com siRNA anti-TNF- $\alpha$ ) em diferentes razões N/P no pH 6,3 (I = 0,05 mol L <sup>-1</sup> , Conc. fosfato = 0,025 mol L <sup>-1</sup> ) e 7,4 (I = 0,15 mol L <sup>-1</sup> , Conc. fosfato = 0,05 mol L <sup>-1</sup> ) .....	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e composição para síntese dos polímeros das séries I, II e III.....	40
Tabela 2 – Reagentes e composição para síntese dos polímeros da série IV .....	43
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries I e II: derivados com DIPEA de média e alta massa molecular .....	78
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries III: derivados com DEAE e amina quaternária .....	78
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries IV: derivados com DIPEA inseridos na quitosana com os grupos amina primária bloqueados .....	79
Tabela A1 – Valores de $\overline{m}_m$ e de $\beta$ para os polímeros estudados .....	115
Tabela E1 – Grau de substituição por titulação potenciométrica ( $GS_T$ ) dos derivados das séries I e II ..	128

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>B-C</b>	C* bloqueada com anidrido ftálico
<b>B-CD52</b>	B-C substituída com 52% de DIPEA
<b>B-CD68</b>	B-C substituída com 68% de DIPEA
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>C*</b>	Quitosana comercial da Sigma-Aldrich
<b>CH</b>	Quitosana desacetilada de alta massa molecular
<b>CHD16</b>	CH substituída com 16% de DIPEA
<b>CHD16-P<sub>1,9</sub></b>	CHD16 substituída com 1,9% de PEG
<b>CHD16-P<sub>2,7</sub></b>	CHD16 substituída com 2,7% de PEG
<b>CHD32</b>	CH substituída com 32% de DIPEA
<b>CHD32-P<sub>1,3</sub></b>	CHD32 substituída com 1,3% de PEG
<b>CHD32-P<sub>2,6</sub></b>	CHD32 substituída com 2,6% de PEG
<b>CM</b>	Quitosana desacetilada de média massa molecular
<b>CMD15</b>	CM substituída com 15% de DIPEA
<b>CMD15-P<sub>1,7</sub></b>	CMD15 substituída com 1,7% de PEG
<b>CMD34</b>	CM substituída com 34% de DIPEA
<b>CMD34-P<sub>1,3</sub></b>	CMD34 substituída com 1,3% de PEG
<b>CMD34-RITC</b>	CMD34 substituído com RITC
<b>CMD5</b>	CM substituída com 5% de DIPEA
<b>CMD55</b>	CM substituída com 55% de DIPEA
<b>CMD55-P<sub>1,3</sub></b>	CMD55 substituída com 1,3% de PEG
<b>CMDE<sub>16</sub></b>	CM substituída com 16% de DEAE
<b>CMDE<sub>57</sub></b>	CM substituída com 57% de DEAE
<b>CMDE<sub>57</sub>-P<sub>1,5</sub></b>	CMDE <sub>57</sub> substituída com 1,5% de PEG
<b>Conc.</b>	Concentrao
<b>CT</b>	Capacidade de tamponamento
<b>CX</b>	Carbono número X
<b>D<sub>2</sub>O</b>	xido de deutério
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol

<b>DCI</b>	Cloreto de deutério
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DEAE-Cl</b>	Cloridrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina
<b>Dh</b>	Diâmetro hidrodinâmico
<b>DIPEA</b>	Diisopropiletilamina
<b>DIPEA-Cl</b>	Cloridrato de 2-cloroetil-di-isopropilamina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DPA</b>	2-(diisopropilamino)etil metacrilato
<b>dsRNA</b>	RNA dupla fita (do inglês, <i>double stranded RNA</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio imunosorvente ligado à enzima (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i> )
<b>GA</b>	Grau de acetilação
<b>GB</b>	Grau de bloqueio
<b>GD</b>	Grau de desacetilação
<b>GF</b>	Grau de ftalação
<b>GI</b>	Grau de ionização
<b>GlcN</b>	Mero ( $\beta 1 \rightarrow 4$ )2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
<b>GlcNAc</b>	Mero ( $\beta 1 \rightarrow 4$ )2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose
<b>GPC</b>	Cromatografia de permeação em gel (do inglês, <i>Gel Permeation Chromatography</i> )
<b>GS<sub>DEAE</sub></b>	Grau de substituição por DEAE
<b>GS<sub>DIPEA</sub></b>	Grau de substituição por DIPEA
<b>GS<sub>DIPEA-C</sub></b>	Grau de substituição por DIPEA determinado por RMN <sup>13</sup> C
<b>GSH</b>	Glutationa reduzida
<b>GS<sub>OH-DIPEA</sub></b>	Grau de substituição estimado de DIPEA na hidroxila
<b>GS<sub>PEG</sub></b>	Grau de substituição por PEG
<b>GS<sub>RITC</sub></b>	Grau de substituição por RITC
<b>GST</b>	Grau de substituição por DIPEA determinado por titulação
<b>HAc</b>	Hidrogênio metila do grupo acetila

<b>H<sub>AR</sub></b>	Hidrogênios aromáticos do grupo ftaloíla
<b>H<sub>DEAE</sub></b>	Hidrogênios metila do DEAE
<b>H<sub>DIPEA</sub></b>	Hidrogênios metila do DIPEA
<b>H<sub>Glc</sub></b>	Hidrogênios glicopiranosídeos
<b>H-Peg</b>	Hidrogênios metileno do PEG
<b>H<sub>Q-DEAE</sub></b>	Hidrogênios metila ligado à amina quaternária do DEAE
<b>HX</b>	Hidrogênio ligado ao carbono X
<b>Ld</b>	Ladder Plus DNA 1 Kb
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MEV-FEG</b>	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo
<b>MM</b>	Massa molecular
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
<b>MWCO</b>	Massa molecular de corte (do inglês, <i>Molecular Weight Cut-Off</i> )
<b>N/P</b>	Amina/fosfato
<b>N/P<sub>nano</sub></b>	Razão N/P mínima para formação nanopartículas
<b>N/P<sub>zeta</sub></b>	Razão N/P mínima necessária para um potencial zeta positivo
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>O-CD52</b>	B-CD52 após a reação de desbloqueio com NaOH
<b>O-CD68</b>	B-CD68 após a reação de desbloqueio com NaOH
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PDI</b>	Polidispersividade dos políplexos
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PEG-SH</b>	O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PES</b>	Etossulfato de fenazina (do inglês, <i>Phenazine Ethosulfate</i> )
<b>PFA</b>	P-formaldeído
<b>Pfi</b>	Ponto final instrumental

<b>RISC</b>	Complexo silenciador induzido por RNA (do inglês, <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> )
<b>RITC</b>	Isotiocianato de rodamina B
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RNAi</b>	Interferência do RNA
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>siRNA anti-TNF-<math>\alpha</math></b>	siRNA para o bloqueio da expressão de TNF $\alpha$
<b>siRNA</b>	Pequeno RNA de interferência (do inglês, <i>small interfering RNA</i> )
<b>siRNA-FAM</b>	Controle negativo de siRNA marcado com 6-carboxifluoresceína amidita
<b>SPDP</b>	N-Succinimidil 3-(2-piridilditiol) propionato
<b>TAE</b>	Tampão tris-amino-EDTA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> )
<b><math>\zeta</math></b>	Zeta (potencial)

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>		<b>Unidade</b>
$g$	Unidade de medida de aceleração para força centrífuga relativa	$1 g = 9,806 \text{ m s}^{-2}$
$\delta$	Escala delta de deslocamento químico no espectro de ressonância magnética nuclear	ppm
$I$	Força iônica	$\text{mol L}^{-1}$
$\bar{M}_n$	Massa molecular média numérica	Da
$\bar{M}_w$	Massa molecular média ponderal	Da
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	Índice de polidispersão das massas moleculares	-

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1 RNA de interferência aplicado à terapia gênica</b> .....	22
<b>2.2 Carreadores de ácidos nucleicos: vetores</b> .....	23
<b>2.3 Policações no desenvolvimento de vetores multifuncionais</b> .....	24
2.3.1 Quitosana .....	24
2.3.2 Grupos amina: o estado da arte na síntese de vetores nanoestruturados .....	25
2.3.3 Polietilenoglicol (PEG): um agente interfacial para evitar interações indesejadas .....	28
2.3.4 Ligações dissulfeto: tornando reversível a ligação do PEG nos policações .....	29
2.3.5 Desenvolvimento de polímeros anfifílicos .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>4.1 Materiais</b> .....	35
<b>4.2 Instrumentos</b> .....	36
<b>4.3 Rota sintética para obtenção dos polímeros das séries I, II e III</b> .....	36
4.3.1 Desacetilação da quitosana .....	38
4.3.2 Modificação com DIPEA/DEAE em meio aquoso: séries I, II e III .....	38
4.3.3 Modificação com PEG .....	39
4.3.4 Marcação fluorescente com isotiocianato de rodamina B (RITC) .....	40
<b>4.4 Rota sintética para obtenção dos polímeros da série IV</b> .....	41
4.4.1 Bloqueio dos grupos amina com anidrido ftálico .....	42
4.4.2 Modificação com DIPEA em solvente orgânico: série IV .....	42
4.4.3 Desbloqueio dos grupos amina .....	43
<b>4.5 Caracterização dos polímeros</b> .....	43
4.5.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) .....	43
4.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C) .....	45
4.5.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS <sub>RITC</sub> ) via espectroscopia de absorção na região do UV-Visível .....	46
4.5.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC): estimativa da massa molecular dos polímeros .....	47

4.5.5 Capacidade de tamponamento e grau de ionização .....	47
<b>4.6 Preparação e caracterização dos políplexos .....</b>	<b>48</b>
4.6.1 Formação das nanopartículas .....	48
4.6.2 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose .....	49
4.6.3 Espalhamento de luz: determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta das nanopartículas .....	49
4.6.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina .....	50
4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG).....	50
<b>4.7 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas.....</b>	<b>51</b>
<b>4.8 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal.....</b>	<b>52</b>
<b>4.9 Estudo de transfecção <i>in vitro</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Caracterização dos polímeros.....</b>	<b>55</b>
5.1.1 RMN <sup>1</sup> H dos polímeros das séries I, II e III .....	55
5.1.1.1 Grau de desacetilação (GD) das quitosanas de partida (séries I, II, III).....	55
5.1.1.2 Grau de substituição de DIPEA (GS <sub>DIPEA</sub> ) na quitosana (séries I e II) .....	57
5.1.1.3 Grau de substituição de DEAE (GS <sub>DEAE</sub> ) na quitosana (série III).....	60
5.1.1.4 Grau de substituição por PEG (GS <sub>PEG</sub> ) nos derivados (séries I, II e III) .....	62
5.1.2 RMN <sup>13</sup> C: estimativa do grau de substituição de DIPEA na hidroxila (GS <sub>OH-DIPEA</sub> ) nos polímeros (séries I e II).....	66
5.1.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS <sub>RITC</sub> ) via espectroscopia da absorção na região do UV-visível .....	69
5.1.4 RMN <sup>1</sup> H: polímeros da série IV .....	71
5.1.4.1 Grau de desacetilação (GD) e bloqueio (GB) da quitosana (série IV) .....	71
5.1.4.2 Grau de bloqueio (GB) e substituição por DIPEA (GS <sub>DIPEA</sub> ) dos polímeros (série IV).....	73
5.1.5 GPC: massa molecular dos polímeros .....	77
5.1.6 Capacidade de tamponamento (CT) .....	79
5.1.7 Grau de ionização (GI) dos polímeros em função do pH .....	82
<b>5.2 Caracterização das nanopartículas.....</b>	<b>84</b>

5.2.1 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose .....	84
5.2.2 Potencial Zeta ( $\zeta$ ), diâmetro hidrodinâmico (Dh) e polidispersividade (PDI) das nanopartículas por meio do espalhamento de luz .....	88
5.2.3 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina .....	92
5.2.4 MEV-FEG das nanopartículas .....	95
<b>5.3 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas .....</b>	<b>96</b>
<b>5.4 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal .....</b>	<b>100</b>
<b>5.5 Avaliação da eficiência de transfecção via monitoramento da expressão de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>102</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE A – Razão molar e N/P: valores de <math>\overline{m}_m</math> e de <math>\beta</math> .....</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE B – Equação para determinar o hidrogênio de referência dos derivados da série IV e lógica envolta na determinação da quantidade de hidrogênios .....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE C – Polímeros com PEG: RMN <math>^1\text{H}</math> e sínteses adicionais .....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE D – Curvas analíticas e cromatogramas de GPC .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE E – Titulações potenciométricas: derivadas e uma nova forma de estimar o grau de substituição.....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE F – Caracterizações adicionais para alguns polímeros das séries III e IV .....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE G – Efeito do pH e da força iônica na formação dos poliplexos.....</b>	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A terapia gênica consiste no tratamento de doenças por meio da inserção de material genético em células específicas de um paciente (JAYAKUMAR et al., 2010), e tem se mostrado uma alternativa promissora para tratar várias doenças humanas (HAN, 2007; LINDEN, 2008). Uma de suas aplicações envolve silenciamento de genes, via introdução de RNAs de interferência nas células, com o intuito de evitar a síntese de proteínas que resultam na manifestação clínica de uma doença (ALBERTS et al., 2011).

Os ácidos nucleicos sem transportador dificilmente conseguem adentrar nas células e assim, não conseguem manifestar seu efeito terapêutico (DOWDY, 2017; TIERA et al, 2013). Isso ocorre porque eles são macromoléculas carregadas negativamente (em pH fisiológico, grupos fosfato dos nucleotídeos apresentam carga negativa) e, portanto, apresentam uma repulsão eletrostática contra membrana plasmática, que também possui uma densidade de carga negativa (SALCHER; WAGNER, 2010). Deste modo, torna-se necessário o uso de agentes que possibilitem a introdução dos ácidos nucleicos na célula-alvo. Na terapia gênica, esses agentes são chamados de vetores.

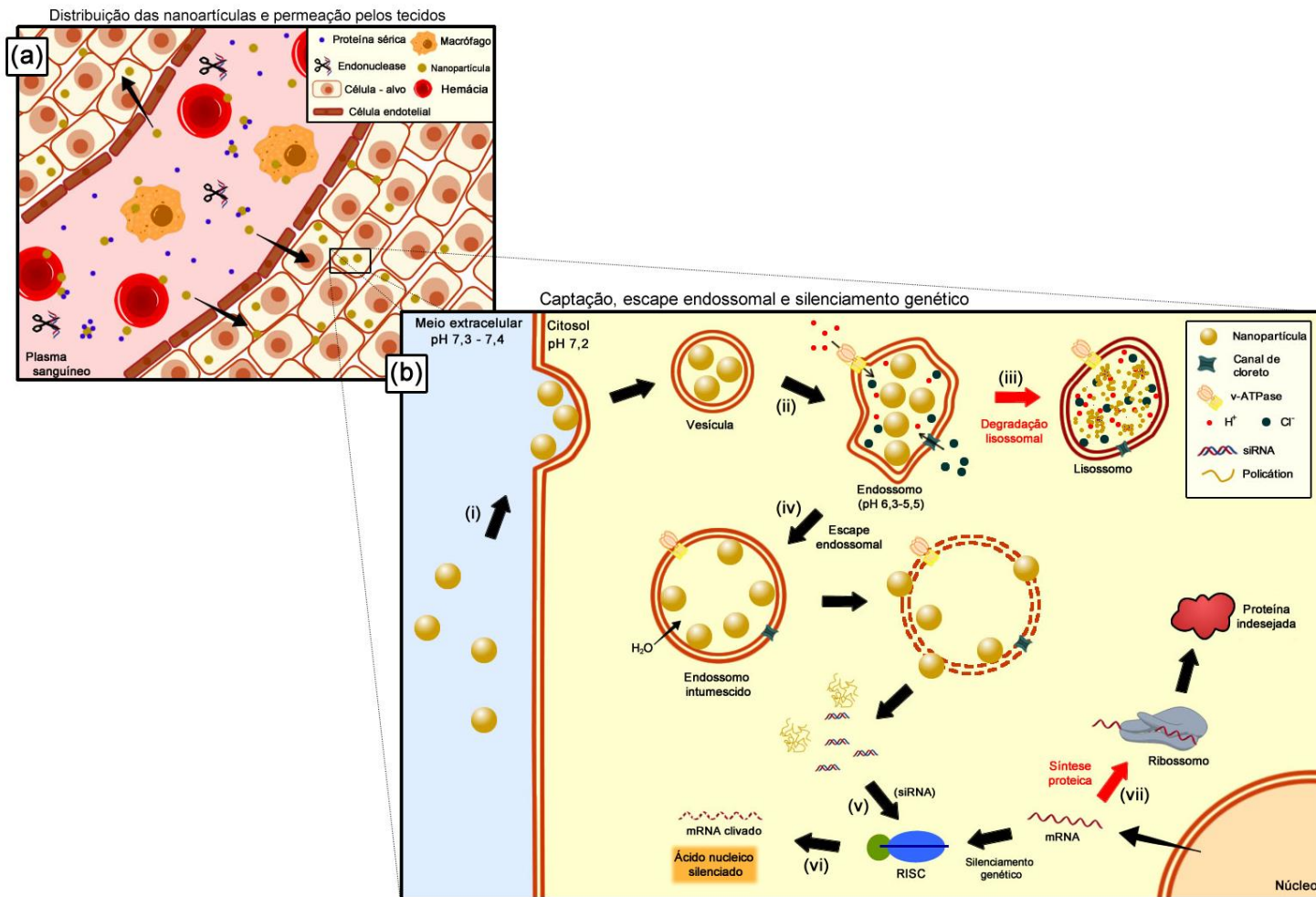
Os vetores podem ser classificados em dois grandes grupos: virais e não virais (HAN, 2007). Atualmente, os vetores virais são os mais aplicados em ensaios clínicos (GENE..., 2018) e constituem um número expressivo de medicamentos (GINN et al., 2018). Porém, a maior facilidade de produção (AIRES, 2008), a maior segurança na aplicação (CHEN et al., 2016) e a obtenção de níveis de transfecção cada vez mais elevados (HAN, 2007) são algumas vantagens dos vetores não virais que os tornam uma alternativa promissora em relação aos vetores virais.

O desenvolvimento de vetores não virais eficientes continua sendo um desafio, devido aos vários obstáculos que devem ser superados para que os ácidos nucleicos possam atingir o seu local de ação, no interior das células alvo. O primeiro grande obstáculo é a distribuição pelo organismo (Figura 1a), devido à possibilidade de ocorrer interações destrutivas com células e proteínas presentes no plasma sanguíneo (TIERA et al., 2013), depuração renal (GIACOMELLI et al., 2011) e clivagem do material genético por nucleases séricas (CHEN et al., 2016). Além de distribuírem-se pelo plasma sanguíneo, os vetores, que neste caso são nanoestruturados (nanopartículas), também precisam difundir pelos tecidos e interagir com as células-alvo (Figura 1b, i), para serem internalizados em estruturas vesiculares que posteriormente são transportadas pelo citosol (ALBERTS et al., 2010).

O principal mecanismo de internalização de vetores não virais (pelas células) é a endocitose (KHALIL et al., 2006; DOWDY, 2017). Essa via (Figura 1b, ii) apresenta diferentes destinos para os compartimentos intracelulares formados (KHALIL et al., 2006) e depende do tipo de célula-alvo e das características físico-químicas das substâncias endocitadas (AGIRRE et al., 2014; DOWDY, 2017). Porém sabe-se que em geral, há um aumento progressivo da acidez no interior desses compartimentos (via ação da enzima v-ATPase), que levam a degradação das substâncias (Figura 1b, iii) (KHALIL et al., 2006) por meio da ativação de hidrolases lisossomais (ALBERTS et al., 2010). Portanto, os vetores devem possuir a habilidade de escapar desses ambientes antes de serem degradados. Para nanopartículas sensíveis ao pH, sintetizadas a partir de polycations, o mecanismo conhecido como “esponja de prótons” é comumente referido como o processo responsável por promover essa fuga. Tal mecanismo, sugere que a protonação das cadeias poliméricas promove aumentos tanto na carga superficial das nanopartículas, como na pressão osmótica no interior do compartimento. Combinadas, essas mudanças contribuem para a desestabilização da membrana do compartimento (Figura 1b, iv) e ocasiona na liberação do ácido nucleico no citosol (AGIRRE et al., 2014; BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; KHALIL et al., 2006).

Deste modo, conclui-se que os sistemas de entrega devem possuir múltiplas características que satisfaçam as necessidades de todos os estágios de transporte dos ácidos nucleicos, desde sua encapsulação até a liberação no interior das células-alvo (ZHOU et al., 2016). Visando atender essas necessidades, neste estudo, foram sintetizados polycations bioresponsivos baseados em quitosana para formação de vetores multifuncionais. Estes vetores foram aplicados no silenciamento genético (Figura 1b vi), via ação de um pequeno RNA de interferência (siRNA) (Figura 1b, v), com o intuito de reduzir a expressão (Figura 1b, vii) de uma citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos RAW 264.7.

Figura 1 – Principais estágios da entrega de ácidos nucleicos usando vetores nanoestruturados, desde (a) a distribuição (vaso sanguíneo) e permeação pelos tecidos até (b) a captação, escape endossomal e silenciamento genético via RNA de interferência (siRNA). As setas vermelhas indicam vias indesejadas



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Alberts et al., 2010; Blanco; Shen; Ferrari, 2015; Casey; Grinstein; Orłowski, 2010; Elsabahy; Wooley, 2012; Layek; Singh, 2016; Tiera et al., 2013

## 6 CONCLUSÕES

A preparação dos derivados foi realizada com êxito e permitiu a obtenção de polímeros com diferentes composições e MM. O sucesso das sínteses foi confirmado por meio de caracterizações realizadas pelas espectroscopias de RMN  $^1\text{H}$ . A CM e CH apresentaram altos níveis de desacetilação, e seus derivados apresentaram GS proporcionais à quantidade de substituinte utilizado nas sínteses. O  $\text{GS}_{\text{PEG}}$  se manteve entre 1-2% nos polímeros da série I e III e foi variado nos derivados da série II. Nos polímeros da série III foram obtidos derivados com DEAE que apresentaram elevados graus de quaternização. A reação de bloqueio da quitosana para iniciar os derivados da série IV, também se mostrou eficiente, com o bloqueio de todos os grupos amina do polímero. A adição de DIPEA na hidroxila da quitosana bloqueada foi realizada com êxito, evidenciado pelo elevado GS após a reação de desbloqueio, que originou polímeros anfifílicos com um potencial de aplicação na terapia gênica.

Nos derivados das séries I e II, foi possível estimar o grau de substituição na hidroxila por meio do RMN  $^{13}\text{C}$ . Essa técnica, também apresentou porcentagens de substituição muito próximas às baseadas na RMN  $^1\text{H}$ , confirmando os valores obtidos.

A CPG permitiu estimar as massas moleculares e os resultados mostram que as reações em meio alcalino promoveram a degradação das cadeias poliméricas.

A inserção do DIPEA e DEAE ampliaram a CT e o GI dos polímeros em relação as quitosanas, entretanto, na CT essa ampliação não foi proporcional ao GS dos derivados. A elevação do GI indicou uma maior proteção do siRNA em pH fisiológico, o que foi corroborado pelos ensaios de liberação em gel de agarose. Os padrões na liberação do siRNA dos políplexos nas eletroforeses indicaram que a elevação do GS promove uma complexação mais eficiente com o siRNA, enquanto que  $\text{GS}_{\text{PEG}}$  maiores podem diminuir a intensidade desta interação.

Neste trabalho, foi indicado o potencial de aplicação dos derivados das séries III e IV na formação de vetores não virais. Estudos mais aprofundados relacionados ao tamanho, potencial zeta, citotoxicidade e eficiência no silenciamento genético foram restritos aos derivados das séries I e II.

Nanopartículas com Dh entre 100-200 nm e potencial zeta positivo foram obtidas a partir da razão N/P 3 em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ( $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ). No monitoramento do Dh com o tempo, observou-se a presença de nanopartículas com Dh entre 100-

200 nm, mesmo após 24 horas de estudo na ausência de albumina e até 7 horas na presença de BSA. Derivados com  $GS_{DIPEA}$  e MM maiores, formaram nanopartículas (com potencial zeta positivo) em razões N/P menores e apresentaram maior estabilidade coloidal. Em geral, a peguilação aumentou a estabilidade biológica dos poliplexos, porém seus efeitos mostraram-se dependentes do  $GS_{DIPEA}$  (série I). Nanopartículas com morfologia esférica foram obtidas na razão N/P 10.

Estudos de citotoxicidade com MTS em macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (3T3/NIH), comprovam a aplicabilidade *in vitro* dos sistemas propostos, indicando uma viabilidade celular superior a 70% para todos os polímeros e superior a 75% para os todos os poliplexos até a razão N/P 10.

A microscopia confocal, indicou uma alta eficiência na liberação de siRNA na célula-alvo. Nos estudos de transfecção foi inserido siRNA anti-TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 via poliplexos, e o resultados comprovaram a eficiência dos nanocarreadores desenvolvidos, pela diminuição de até 60% na expressão de TNF- $\alpha$ . Esses resultados também indicaram uma concordância com as características físico-químicas dos poliplexos, uma vez que foi possível estabelecer relações entre a razão N/P, Dh, potencial zeta e estabilidade biológica das nanopartículas com a eficiência de transfecção.

Diante dos resultados apresentados, tem-se como perspectivas futuras a realização de estudos de transfecção *in vivo* (para o bloqueio da expressão TNF- $\alpha$ ) dos polímeros (na forma de poliplexos) que apresentaram os melhores resultados de transfecção *in vitro* (CMD34-P<sub>1,3</sub>, CMD55 e CHD32 mais suas versões peguiladas), além de estudos de silenciamento genético utilizando esses derivados visando o tratamento de outras patologias.

## REFERÊNCIAS

- ADRIAANSEN, J.; VERVOORDELDONK, M. J. B. M.; TAK, P. P. Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes. **Rheumatology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 656-668, 2006.
- AGIRRE, M. *et al.* Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: from bench to bedside. **Polymers**, Basel, v. 6, p. 1727-1755, 2014.
- ALAMEH, M. *et al.* siRNA delivery with chitosan: influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on in vitro silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and in vivo efficacy. **Biomacromolecules**, Washington, v. 19, n. 1, p. 112-131, 2017.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- AMIJI, M. M. **Polymeric gene delivery: principles and applications**. New York: CRC Press, 2004.
- ATZENI, F. *et al.* Investigating the potential side effects of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis: cause for concern? **Immunotherapy**, London, v. 7(4), p. 353-361, 2015.
- BEREZHNA, S. Y. *et al.* siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 20, p. 7682-7687, 2006.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticles design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.
- BRAMSEN, J. B.; KJEMS, J. Development of therapeutic-grade small interfering RNAs by chemical engineering. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 3, n. 154, p. 1-22, 2012.
- BROWN, R.; BÖGER-BROWN, U. **Cytotoxic drug resistance mechanisms**. Springer Science & Business Media, 1999.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Arliber, 2002.
- CASEY, J. R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature reviews: molecular cell biology**, London, v. 11, p. 50-61, 2010.
- CELLTITER 96<sup>®</sup> aqueous one solution cell proliferation assay: instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. **Technical Bulletin**, Madison, 2012.

CHEN, J. *et al.* Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. **Molecular Therapy: methods & clinical development**, London, v. 3, n. 16023, p. 1-8, 2016.

CHOOCHOTTIROS, C.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Amphiphilic chitosan nanospheres: factors to control nanospheres formation and its consequent responsive performance. **Polymer**, London, v. 50, p. 1877-1886, 2009.

CORBET, C. *et al.* Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 223, p. 53-63, 2016.

DOWDY, S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 35, n. 3, p. 222-229, 2017.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: nanocarriers**. San Francisco: Springer, 2016.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, London, v. 41, p. 2545-2561, 2012.

FIAMINGO, A; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 143, p. 155-163, 2016.

FUJITA, S.; SAKAIRI, N. Water soluble EDTA-linked chitosan as a zwitterionic flocculant for pH sensitive removal of CU(II) ion. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, p. 10385-10392, 2016.

GENE therapy clinical trials worldwide. **The Journal of Gene Medicine**, Hoboken, c2017. Available in: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>. Access in: 30 aug. 2018.

GIACOMELLI, F. C. *et al.* pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPD (poly-[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly-(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. **Soft Matter**, Cambridge, v. 7, p. 9316-9325, 2011.

GINN, S. L. *et al.* Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update. **Journal of Gene Medicine**, Hoboken, v. 20, p. 1-16, 2018.

GONSALVES, A. D. A. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GORMLEY, A. J.; GHANDEHARI, H. Evaluation of toxicity of nanostructures in biological systems. *In*: SAHU, S. C.; CASCIANO, D. A. **Nanotoxicity: from in vivo and in vitro models to health risks**. Wiley, 2009.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 29-33, 2004.

GROSSMAN, R. F.; NWABUNMA, D. **Biopolymer nanocomposites**: processing, properties, and applications. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. p. 115-159.

GUNN, J.; PARANJI, R. K.; ZHANG, M. A simple and highly sensitive method for magnetic nanoparticle quantitation using  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. **Biophysical Journal**, New York, v. 97, p. 2640-2647, 2009.

HAN, S. W. Introdução: história da terapia gênica, estado da arte, técnicas e ética. *In*: MORALES, M. M. **Terapias avançadas**: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 105-119.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n. 2, p. 344-353, 2004.

IFUKU, S. *et al.* Preparation of highly chemoselective N-phthaloyl chitosan in aqueous media. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 13, p. 1499-1502, 2011.

INÁCIO, A. S. *et al.* In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p.1-15, 2011.

JAIN, A. *et al.* A new horizon in modifications of chitosan: syntheses and applications. **Clinical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Danbury, v. 30, n. 2, p. 91-181, 2013.

JAIN, S. *et al.* Multifunctional nanoparticles for targeting cancer and inflammatory diseases. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 888–903; 2013.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, Barking, n. 79, p. 1-8, 2010.

JIANG, L. Q. *et al.* Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intracellular transport. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 12, p. 6383-6398, 2017.

JONES, C. H. *et al.* Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. **Molecular Pharmaceutics**, Wasington, v. 10, n. 11, p. 4082-4098, 2013.

KASAAI, M. *et al.* The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 120, p. 201-205, 1999.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 69, p. 3-11, 2010.

KHALIL, I. A. *et al.* Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacology Reviews**, [s. l.] v. 58, n. 1, p. 32-45, 2006.

KIM, S. H. *et al.* Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 129, p. 107-116, 2008.

KUMIRSKA, J. *et al.* Biomedical activity of chitin/chitosan based materials: influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, n. 3, Basel, p. 1875-1901, 2011.

KURITA, K. *et al.* Chemoselective protection of the amino groups of chitosan by controlled phthaloylation: facile preparation of a precursor useful for chemical modifications. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 1, 2002.

KURITA, K. *et al.* N-Phthaloylated chitosan as an essential precursor for controlled chemical modifications of chitosan: synthesis and evaluation. **Polymer Journal**, [s. l.] v. 39, n. 9, p. 945-952, 2007.

LAVERTU, M. *et al.* High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, Surrey, v. 27, p. 4815-4824, 2006.

LAYEK, B.; SINGH J. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: effect of degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 447, p. 182-181, 2013.

LAYEK, B.; SINGH, J. Chitosan for DNA and gene therapy. *In*: JENNINGS J. A; BUMGARDNER J. D. **Chitosan based biomaterials: tissue engineering and therapeutics**. v. 2. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 209-244.

LAYEK, B. *et al.* Hexanoic acid and polyethylene glycol double grafted amphiphilic chitosan for enhanced gene delivery: Influence of hydrophobic and hydrophilic substitution degree. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 11, p. 982-994, 2014.

LEE, Y.; KATAOKA, K. Delivery of nucleic acid drugs. *In*: **Nucleic Acid Drugs**. Berlin: Springer, 2011. p. 95-134.

LI, R. *et al.* Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 9, p. 46-52, 2016.

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

LINDEN, R. **Genes contra doenças: terapia gênica: uma nova era na genética**. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2008.

MA, O. *et al.* Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 72, n. 4, p. 616-624, 2008.

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

MARTINS, G. O. *et al.* Amphipathic chitosans improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 216, p. 332-342, 2019.

MOBARAKEH, V. I. *et al.* Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 129, p. 305-315, 2019.

MORALES, M. M.; LINDEN, R.; HAN, S. W. Bases fisiológicas da terapia gênica. In: AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. p. 1189-1199.

NEELAMEKAM, S. *et al.* The impact of lipoprotein lipase deficiency on health-related quality of life: a detailed structured, qualitative study. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, London, v. 12, n. 156, p. 1-9, 2017.

NEL, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, London, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, F. D. P. P. *et al.* Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the *in vitro* transfection efficiency. **Nanotechnology**, Bristol, v. 24, p. 1-11, 2013.

PANDI, P. *et al.* Therapeutic approaches for the delivery of TNF- $\alpha$  siRNA. **Therapeutic Delivery**, London, v. 8, n. 5, p. 343-355, 2017.

PICOLA, I. P. D. *et al.* Chitosan derivatives for gene transfer: effect of phosphorylcholine and dethylaminoethyl grafts on the *in vitro* transfection efficiency. **Journal of Biomaterials Science**, Abingdon, v. 27, n. 16, p. 1611-1630, 2016.

PICOLA, I. P. D. *et al.* Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, Abingdon, v. 8, n. 5, p. 703-716, 2013.

REHMAN, Z. U.; HOEKSTRA, D.; ZUHORN, I. S. Mechanism of polyplex-and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. **ACS Nano**, Washington, v. 7, n. 5, p. 3767-3777, 2013.

RHEINER, S.; BAE, Y. Increased poly(ethylene glycol) density decreases transfection efficacy of siRNA/poly(ethylene imine) complexes. **Bioengineering**, Wiesbaden, v. 3, n. 4, p. 454-467, 2016.

ROUSSELET, G. **Macrophages: methods and protocols**. 5. ed. New York: Humana Press, 2018.

RUDZINSKI, W. E. *et al.* Targeted delivery of small interfering RNA to colon cancer cells using chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, Barking, v. 147, p. 323-332, 2016.

SALCHER, E. E.; WAGNER, E. Chemically programmed polymers for targeted DNA and siRNA transfection. *In: Nucleic acid transfection*. Berlin: Springer, 2010. p. 227-250.

SARKAR, K.; KUNDU, P. P. PAMAM conjugated chitosan through naphthalimide moiety for enhanced gene transfection efficiency. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 98, p. 495-504, 2013.

SCHERMAN, D. *et al.* Genetic pharmacology: progress in siRNA delivery and therapeutic applications. **Gene Therapy**, London, v. 24, p. 151-156, 2017.

SCOTT, L. J. Alipogebe tiparvevoc: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. **Drugs**, Auckland, v. 75, n. 2, p. 175-182, 2015.

SHI, Q. *et al.* In vivo therapeutic efficacy of TNF $\alpha$  silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 13, p. 387, 2018.

SHUAI, H. *et al.* Using surfaces to modulate the morphology and structure of attached cells—a case of cancer cells on chitosan membranes. **Chemical Science**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 3058-3067, 2013. Supplementary Information.

SIEWERT, C. *et al.* Investigation of charge ratio variation in mRNA–DEAE–dextran polyplex delivery systems. **Biomaterials**, Surrey, v. 192, p. 612-620, 2019.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature Reviews: immunology**, London, v. 13, p. 592-605, 2013.

SOUZA, H. F. V. de *et al.* Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 119, p.186-197, 2018.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. **Food polysaccharides and their applications**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

TAMURA, A.; YUI, N. A supramolecular endosomal escape approach for enhancing gene silencing of siRNA using acid-degradable cationic polyrotaxanes. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, n. 29, p. 3535-3544, 2013.

TAMURA, A.; YUI, N. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 4356, p. 1-8, 2014.

TANG, G. P. *et al.* Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, p. 2351-2362, 2003.

TIERA, M. J. *et al.* Polycation-based gene therapy: current knowledge and new perspectives. **Current Gene Therapy**, Sharjah, v. 11, n. 4, p. 288-306, 2011.

TIERA, M. J. *et al.* Polymeric systems as nanodevices for siRNA delivery. **Current Gene Therapy**, Sharjah, v. 13, n. 5, p. 358-369, 2013.

TORRECILLA, J. *et al.* Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-17, 2014.

WANG, X. *et al.* Glutathione-triggered “off-on” release of anticancer drug from dendrimer-encapsulated gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 135, p. 9805-9810, 2013.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature**, London, v. 496, p. 445-455, 2013.

XUN, M. *et al.* Low molecular weight PEI-based biodegradable lipopolymers as gene delivery vectors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 11, p. 1242-1250, 2013.

YANG, C. *et al.* Impact of PEG chain length on the physical properties and bioactivity of PEGylated chitosan/siRNA nanoparticles in vitro and in vivo. **ACS Applied Materials Interfaces**, Washington, v. 9, n. 14, p. 12203-12216, 2017.

ZHANG, Y.; SATTERLEE, A.; HUANG, L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? **Molecular therapy**, London, v. 20, n. 7, p. 1298-1304, 2012.

ZHANG, K. *et al.* NMR and FT Raman characterization of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfonate groups and the degree of substitution. **Polymer**, London, v. 51, p. 4698-4705, 2010.

ZHOU, G. *et al.* Tumor-penetrating peptide modified and pH-sensitive polyplexes for tumor targeted siRNA delivery. **Polymer Chemistry**, Cambridge, v. 7, p. 3857-3863, 2016.

ZHOU, K. *et al.* Multicolored pH-tunable and activatable fluorescence nanoplateform responsive to physiologic pH stimuli. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 134, p. 7803-7811, 2012.