



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

JULIANA SEMENSATO

**Derivados de Poli(L-Lisina) com Fosforilcolina para
Transferência Gênica Não-Viral**

São José do Rio Preto
2014

JULIANA SEMENSATO

**Derivados de Poli(L-Lisina) com Fosforilcolina para
Transferência Gênica Não-Viral**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

São José do Rio Preto

2014

Semensato, Juliana.

Derivados de poli(L-lisina) com fosforilcolina para transferência gênica não-viral / Juliana Semensato. -- São José do Rio Preto, 2014
82 f. : il., tabs.

Orientador: Marcio José Tiera

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

1. Físico-química. 2. Terapia gênica. 3. Polilisina. 4. Vetores genéticos. 5. Nanopartículas. 6. Fosforilcolina. I. Tiera, Marcio José. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 541.1:542.1

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

JULIANA SEMENSATO

**Derivados de Poli(L-Lisina) com Fosforilcolina para
Transferência Gênica Não -Viral**

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior
UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Julio C. Fernandes
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL – Montréal

São José do Rio Preto
2014

Dedico este trabalho aos meus pais, **Marcos** e **Célia**, por todo amor e apoio constante, ao meu irmão **Marcelo**, por me incentivar sempre, e ao meu amor **Elder**, que esteve comigo nos melhores momentos e nos mais difíceis, sempre disposto a me ajudar.

Vocês foram minhas inspirações e fortalezas. Eu amo vocês!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a **Deus**, que me guia e dá força e entusiasmo para sempre seguir em frente. Sem Ele em minha vida eu não conseguiria superar dificuldades, vencer obstáculos e acreditar que posso sempre aprender e evoluir como pessoa e profissional.

Aos meus pais, **Marcos** e **Célia** e ao meu irmão **Marcelo**, que são o meu alicerce, minha fonte de inspiração, por me incentivar a buscar meus sonhos e me tornar uma pessoa melhor, por todo amor, dedicação, paciência e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado **Elder**, por todo amor, companheirismo e paciência, que tornaram as dificuldades mais fáceis de serem superadas, fazendo do meu dia-a-dia mais feliz. Eu te amo!

Ao **Prof. Dr Marcio José Tiera**, pela orientação, oportunidade, paciência, confiança, ensinamentos e por acreditar em mim e neste projeto. Sua contribuição foi imprescindível para a minha formação e realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr Julio C. Fernandes** pela orientação, oportunidade, amizade, incentivo, confiança e todo o ensinamento transmitido. A oportunidade de estagiar em seu laboratório foi muito importante para mim, como pessoa e profissional.

A **Dra Qin Shi**, ao **Dr. Mohamed Bendehour** e a querida **Patrícia** pela ajuda, excelente receptividade e por tornarem meus dias em Montréal muito agradáveis.

A **Prof. Vera** pela amizade e energia contagiante e a **Jô** que me recebeu em sua casa com muito carinho.

Aos amigos do **Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia**, vocês me acolheram de braços abertos, sempre dispostos a me ajudar e sou muito feliz em fazer parte desta equipe. Gostaria de agradecer em especial a **M.^a Hellen** e a **Dr. Isadora**, pela amizade, ajuda, atenção, disponibilidade, paciência e discussões.

Aos inúmeros **amigos** que **Rio Preto** e **Montréal** me trouxeram, e aos meus “velhos” amigos de **Novo Horizonte** e **Maringá** que sempre me motivaram e apoiaram.

A **CAPES** pela bolsa de mestrado e ao governo canadense pela bolsa **ELAP** (Programa Futuros Líderes nas Américas).

É Proibido

“É proibido chorar sem aprender,
Levantar-se um dia sem saber o que fazer
Ter medo de suas lembranças.

É proibido não rir dos problemas
Não lutar pelo que se quer,
Abandonar tudo por medo,

Não transformar sonhos em realidade.
É proibido não demonstrar amor (...)

(...) É proibido não tentar compreender as pessoas,
Pensar que as vidas deles valem mais que a sua,

Não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.
É proibido não criar sua história,
Deixar de dar graças a Deus por sua vida,

Não ter um momento para quem necessita de você,
Não compreender que o que a vida te dá, também te tira.
É proibido não buscar a felicidade,

Não viver sua vida com uma atitude positiva,
Não pensar que podemos ser melhores,
Não sentir que sem você este mundo não seria igual.”

Pablo Neruda

RESUMO

A terapia gênica baseada em vetores não virais, tais como aqueles que se utiliza de sistemas poliméricos, é uma proposta promissora para o tratamento de doenças que se manifestam devido alguma disfunção gênica. Entretanto, o maior desafio desta técnica é a transferência do material genético, e a maioria dos esforços focaliza o desenvolvimento de vetores eficientes que possam transportar e transferir o DNA de modo seguro e eficaz. Neste trabalho, buscou-se sintetizar derivados de Poli(L-Lisina) (PLL) introduzindo o grupo fosforilcolina (PC) nos grupos amino da PLL, procurando-se variar os graus de substituição, com o objetivo de melhorar as propriedades deste vetor. A caracterização dos derivados foi realizada por RMN de hidrogênio, FTIR-ATR e GPC. O grau de substituição foi determinado com as técnicas de RMN de hidrogênio e potenciometria. A modificação da PLL com PC aumentou a capacidade de tamponamento dos derivados substituídos, o que pode melhorar a eficiência de transfecção. Estudos de interação entre PLL e PLL-PC com o DNA plasmidial VR1412 foram realizados em dois pHs (pH 5,0 e 7,4) por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência, eletroforese em gel de agarose, espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta. Os resultados mostraram que os derivados são capazes de formar poliplexos e que a interação depende do grau de substituição, do pH, e da razão de cargas (razão N/P: razão de mol de grupos amino (polímero) por mol de grupos fosfato (pDNA)). Os estudos de espalhamento de luz dinâmico mostraram a formação de nanopartículas com diâmetros de 150 a 300 nm em pH 5,0 e de 350 a 700 nm em pH 7,4. As partículas exibiram carga superficial positiva ($\sim +25$ mV em pH 5,0 e $\sim +10$ mV em pH 7,4), propriedade importante no processo de internalização dos poliplexos por endocitose. A viabilidade celular utilizando o ensaio colorimétrico com o MTS mostrou que proporções crescentes de PC podem diminuir a citotoxicidade das nanopartículas, e a CI_{50} dos polímeros sintetizados mostraram que a citotoxicidade de PLL diminui favorecendo o processo de transfecção. A eficiência do processo de transfecção “*in vitro*” mostrou-se dependente do grau de substituição, e foi fortemente influenciada pela razão N/P, sendo que todos os derivados apresentaram eficiência de transfecção comparável ao vetor comercial LipofetaminaTM2000. Portanto, verificou-se que a substituição por PC permitiu preparar nanopartículas carregadas positivamente em pH 7,4 com elevada estabilidade coloidal e baixa citotoxicidade “*in vitro*” e ainda pôde-se estabelecer as condições ideais para o uso das mesmas como possíveis vetores não-virais aplicáveis à transferência gênica.

Palavras chaves: Poli(L-Lisina). Fosforilcolina. Nanopartículas. Transfecção Gênica. pDNA. β -gal.

ABSTRACT

Gene therapy based on non-viral vectors, such as those that utilize polymeric systems, is a promising treatment for diseases that arise due some genetic disorder. However the challenge of using this technique is the transfer of the genetic material and most of the efforts have focused on the development of effective vectors to efficiently deliver the DNA into the cells. In this work, the main purpose was to synthesize PLL derivatives containing increasing proportions of the group phosphorylcholine (PC), aiming to improve the PLL properties as a non viral vector. The derivatives were characterized by ^1H NMR, FTIR-ATR and GPC techniques. The degree of substitution was determined by ^1H NMR and potentiometry. The buffering capacity was evaluated and showed the grafting with PC groups increased the buffering capacity, which may improve the transfection efficiency. The interaction between PLL and PLL-PC derivatives and the plasmid VR 1412, was studied at two pH values (pH 5.0 and 7.4) by fluorescence, agarose gel electrophoresis, dynamic light scattering and zeta potential techniques. The results showed that all derivatives were able to form polyplexes depending on the degree of substitution, pH and the charge ratio (N/P, the ratio of amino groups to phosphate groups from the pDNA). Nanoparticles prepared using the coacervation process showed sizes varying from 150 to 300 nm at pH 5.0 and from 350 to 700 nm at pH 7.4. The particles exhibited positives surface charges ($\sim +25$ mV at pH 5.0 and $\sim +10$ mV at pH 7.4) an important property for promoting the internalization process by endocytosis. Cell viability using the MTS colorimetric assay showed that increasing proportions of PC groups can reduce the cytotoxicity of nanoparticles, and IC_{50} values for the synthesized polymers were graphically determined. The in vitro transfection efficiencies were shown to depend on the degree of substitution and N/P ratio and all the derivatives showed efficiency comparable to commercial vector LipofetamineTM2000. Therefore, it was found that the substitution of phosphorylcholine allowed prepare positively charged nanoparticles at pH 7.4 with high colloidal stability and low cytotoxicity in vitro and can still establish ideal conditions for the use of the same as possible non-viral vectors applicable to gene transfer.

Keywords: Poly(L-Lysine). Phosphorylcholine. Nanoparticles. Genic Transfection. pDNA. β -gal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indicações clínicas referentes aos ensaios na área de terapia gênica até junho de 2013. Figura adaptada de “ <i>The Journal of Gene Medicine</i> ”, 2013. (http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical).....	17
Figura 2. Construção de um vetor viral para a Terapia Gênica. (Retirada de LINDEN, 2010).....	18
Figura 3. Vetores utilizados em ensaios clínicos. Figura adaptada de “ <i>The Journal of Gene Medicine</i> ”, junho de 2013 http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical).....	19
Figura 4. Representação esquemática do processo de endocitose, formação do endossomo e mecanismo de liberação intracelular de pDNA pelo mecanismo “esponja de prótons.....	26
Figura 5. Estrutura química do polycation PLL.....	27
Figura 6. Estrutura química do grupo substituinte fosforilcolina gliceraldeído (PC).....	29
Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de não-trombogenicidade observado para o polímero MPC. (Adaptado de IWASAKI e ISHIHARA, 2005).....	30
Figura 8. Mecanismo da síntese de modificação da PLL com PC via aminação-reductiva.....	34
Figura 9. (A) Estrutura dos derivados de PLL-PC: hidrogênios utilizados na determinação do grau de substituição em vermelho. (B) Espectro de RMN de ¹ H representativo dos derivados de PLL-PC (PLL-PC7,5%).....	37
Figura 10. Representação esquemática do ensaio com EtBr em meio aquoso para estudo da interação de PLL e seus derivados com pDNA.....	40
Figura 11. (A) Estrutura química da Fosforilcolina Gliceraldeído contendo as atribuições dos sinais dos hidrogênios. (B) Espectro de RMN de ¹ H do PC com as respectivas atribuições, obtido em D ₂ O/DCl (1:100) a 25 °C com frequência de 500 MHz.....	45
Figura 12. Espectro de FTIR-ATR para o composto Fosforilcolina Gliceraldeído (PC).....	46
Figura 13. Representação da síntese dos derivados zwitteriônicos de PLL substituídos pelo grupo PC.....	47
Figura 14. (A) Estrutura genérica dos derivados PLL-PC com identificação dos prótons utilizados na determinação do grau de substituição. (B) Espectros de RMN de ¹ H do grupo	

substituinte PC, da Poli(L-Lisina) e seus derivados modificados, PLL-PC7,5% e PLL-PC20% e PLL-PC40% obtidos em D ₂ O/DCl (1:100) a 25 °C com frequência de 500 MHz.....	48
Figura 15. Espetros de FTIR-ATR para a PLL e seus derivados modificados com PC com diferentes graus de substituição.....	49
Figura 16. Titulação potenciométrica de PLL-PC7,5% para determinação do grau de substituição.....	50
Figura 17. Titulação potenciométrica de PLL-PC20% para determinação do grau de substituição.....	51
Figura 18. Titulação potenciométrica de PLL-PC40% para determinação do grau de substituição.....	51
Figura 19. Curva de calibração utilizando padrões de massa molar monodisperso no intervalo de 6200 a 805000 Da.....	53
Figura 20. Curva de distribuição de massa molar da PLL e seus derivados modificados com o grupo zwitteriônico PC.....	54
Figura 21. Capacidade de tamponamento da PLL e seus derivados em solução de NaCl 150 mmol.L ⁻¹ titulado com HCl.....	55
Figura 22. Titulação do complexo pDNA-EtBr por PLL e PLL substituídas com grupos PC em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ a 25 °C.....	56
Figura 23. Titulação do complexo pDNA-EtBr por PLL e PLL substituídas com grupos PC em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ a 25°C.....	57
Figura 24. Eletroforeses em gel de agarose dos poliplexos PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ (A) PLL; (B) PLL-PC7,5%; (C) PLL-PC20%; (D) PLL-PC40%.....	59
Figura 25. Eletroforeses em gel de agarose dos poliplexos PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em tampão fosfato pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ . (A) PLL; (B) PLL-PC7,5%; (C) PLL-PC20%; (D) PLL-PC40%.....	60
Figura 26. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em função da razão N/P em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica 150 mmol.L ⁻¹	61
Figura 27. Potencial zeta das nanopartículas formadas em função da razão N/P em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica 150 mmol.L ⁻¹	63
Figura 28. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em função da razão N/P em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹	64
Figura 29. Potencial zeta das nanopartículas formadas em função da razão N/P em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹	64

Figura 30. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA na razão N/P 3,0, tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ em função do tempo (minutos).....	65
Figura 31. Estrutura do sal de tetrazólio MTS e seu produto formazana.....	66
Figura 32. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função da concentração de PLL e PLL substituídas com grupos PC.....	67
Figura 33. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função de diferentes razões N/P para as nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA, preparadas em pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹	69
Figura 34. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função de diferentes razões N/P para as nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA, preparadas em pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹	70
Figura 35. Eficiência de transfecção “ <i>in vitro</i> ” em células HeLa para as nanopartículas formadas pela PLL e seus derivados com o DNA plasmidial VR1412, avaliada em pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L ⁻¹ . Valores de expressão da β-gal (pg)/ proteínas totais (mg) em função da razão N/P, (n=3; *** p < 0,0001).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos principais vetores virais utilizados na terapia gênica anti-câncer (Adaptada de Ortiz <i>et al.</i> , 2012).....	20
Tabela 2. Polímeros sintéticos e naturais utilizados como vetores não virais em transfecção gênica (Adaptada de Hosseinkhani <i>et al.</i> , 2013).....	24
Tabela 3. Grau de substituição dos derivados substituídos com PC por meio das técnicas de RMN de ¹ H e potenciometria.....	51
Tabela 4. Valores de massa molar ponderal média (Mw), massa molar numérica média (Mn) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) para PLL e seus derivados, obtidos por cromatografia de permeação em gel (GPC).....	53
Tabela 5. Valores de CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹) para PLL, derivados substituídos com fosforilcolina e o lipídeo catiônico comercial Lipofectamina TM 2000.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA	Ácido Bicinconínico
CI ₅₀ celular	Concentração na qual ocorre 50% de inibição da viabilidade celular
CMV	Citomegalovírus
ctDNA	DNA de Timo de Bezerro
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Meio de cultura celular Dulbecco Mem
DEAE-dextrana	Dietilaminoetil dextrana
EtBr	Brometo de Etídeo
FBS	Soro Fetal Bovino
FTIR-ATR Atenuada	Espectroscopia de Infravermelho por Reflectância Total Atenuada
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GS	Grau de Substituição
Mn	Massa Molar Numérica média
Mw	Massa Molar Ponderal média
Mw/Mn	Índice de Polidispersividade
MPC	Metacriloiloxietil fosforilcolina
MTS sulfofenil)-2H-tetrazólio	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
nm	Nanômetros
N/P DNA (P)	Razão de grupos amino do polímero (N) por grupos fosfato de DNA (P)
PAMAM	Poliamidoamina
PBS	Tampão Fosfato Salino

PC	Fosforilcolina gliceraldeído
pDNA	DNA plasmidial
PDMAEMA	Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]
PTMAEMA	Poli(trimetilamino)etil metacrilato
PEG	Poli(etileno)glicol
PEI	Polietilenoimina
PLL	Poli(L-Lisina)
PLL-PC7,5%	Poli(L-Lisina) modificada com fosforilcolina na proporção 7,5%
PLL-PC20%	Poli(L-Lisina) modificada com fosforilcolina na proporção 20%
PLL-PC40%	Poli(L-Lisina) modificada com fosforilcolina na proporção 40%
PMS	Metasulfato de Fenazina
PS	Penicilina- estreptomicina
RMN de ¹ H Hidrogênio	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de
β-gal	β-galactosidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Terapia gênica	16
1.2	Terapia gênica viral	17
1.3	Terapia gênica não-viral	21
1.4	Vetores poliméricos utilizados em terapia gênica não viral	22
1.5	Poli(L-Lisina)	27
1.6	Fosforilcolina gliceraldeído	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos gerais	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Materiais	32
3.2	Síntese de fosforilcolina gliceraldeído	32
3.3	Síntese dos derivados	33
3.4	Caracterização dos derivados de PLL modificados com fosforilcolina (PLL-PC)	36
3.4.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e espectroscopia de infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)	36
3.5	Determinação do grau de substituição por RNM de ^1H	37
3.6	Determinação do grau de substituição por potenciometria	38
3.7	Determinação da massa molar e polidispersividade dos polímeros por cromatografia de permeação em gel (GPC)	38
3.8	Determinação da capacidade de tamponamento	39
3.9	Amplificação e purificação do plasmídeo (pDNA)	39
3.10	Preparação de nanopartículas poliméricas com pDNA por coacervação	39
3.11	Avaliação da estabilidade e tamanho das nanopartículas em função de diferentes condições experimentais	40
3.11.1	Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados utilizando-se o ensaio com brometo de etídio	40
3.11.2	Eletroforese em gel de agarose	41
3.11.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e medidas de potencial zeta	42

3.12 Estudos de citotoxicidade e transfecção “<i>in vitro</i>”	42
3.12.1 Estudo da citotoxicidade dos polímeros	42
3.12.2 Estudo da citotoxicidade das nanopartículas	43
3.12.3 Estudos de eficiência de transfecção “ <i>in vitro</i> ” utilizando o plasmídeo VR1412	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Síntese e caracterização de fosforilcolina gliceraldeído (PC)	45
4.2 Síntese e caracterização dos derivados PLL-PC por RMN de ¹ H e FTIR-ATR	47
4.3 Determinação do grau de substituição por potenciometria	50
4.4 Determinação da massa molar e polidispersividade por cromatografia de permeação em gel (GPC)	52
4.5 Determinação da capacidade de tamponamento	54
4.6 Avaliação da estabilidade e tamanho das nanopartículas em função de diferentes condições experimentais	55
4.6.1 Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados utilizando-se o ensaio com brometo de etídio	55
4.6.2 Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados por meio de eletroforese em gel de agarose	58
4.6.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e medidas de potencial zeta das nanopartículas preparadas com o pDNA	61
4.7 Estudos de citotoxicidade e transfecção “ <i>in vitro</i> ”	65
4.7.1 Estudos de citotoxicidade dos polímeros	65
4.7.2 Estudos de citotoxicidade das nanopartículas	68
4.7.3 Estudos de transfecção “ <i>in vitro</i> ” utilizando o plasmídeo VR1412	70
5 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapia gênica

A terapia gênica pode ser definida como o tratamento de doenças hereditárias ou adquiridas que se manifestam devido alguma desordem genética, por meio da transferência de material genético para dentro de células específicas de um paciente, com o objetivo de substituir, corrigir ou suplementar genes ausentes ou defeituosos, responsáveis pelo desenvolvimento destas doenças. Assim, esta técnica baseia-se essencialmente no transporte, transferência e expressão de material genético na célula alvo (CRYSTAL, 1995). Portanto, trata-se de uma intervenção terapêutica em nível molecular (ORTIZ *et al.*, 2012).

Este tipo de tratamento pode ser dividido em três categorias, de acordo com a finalidade da ação do material genético transferido: correção, quando o material genético funcional transferido tem a finalidade de corrigir genes não funcionais ou deletérios; complementação, quando o gene funcional transferido apenas complementa genes celulares sem modificações danosas; ou adição, quando há o acréscimo de gene funcional transferido, devido à ausência do gene original no genoma (MATTE e GIUGLIANI, 2004).

A terapia gênica inicialmente foi direcionada para o tratamento de doenças hereditárias monogênicas, como fibrose cística, hemoglobinopatias e distrofia muscular. No entanto, frente à atual e elevada ocorrência de doenças adquiridas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares, os esforços foram redirecionados e estão concentrados para o tratamento destes tipos de enfermidades, cuja incidência na população mundial é superior quando comparada com a frequência de doenças monogênicas (NARDI *et al.*, 2002). Neste aspecto, um levantamento entre os protocolos clínicos referentes aos ensaios na área de terapia gênica até março de 2014, demonstra que 63,8% das indicações clínicas são para o tratamento de câncer, seguido de doenças monogênicas (8,9%) e doenças cardiovasculares (8,4%) (Figura 1).

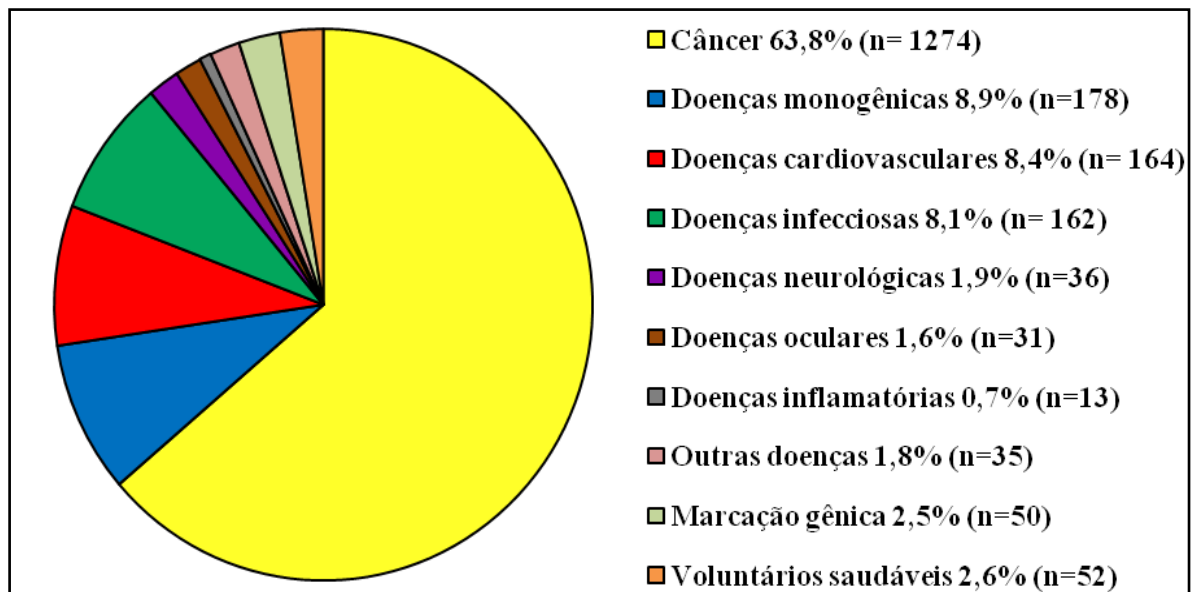


Figura 1. Indicações clínicas referentes aos ensaios na área de terapia gênica até março de 2014. Figura adaptada de “*The Journal of Gene Medicine*”, 2013. (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>).

O maior desafio relacionado à terapia gênica é a transferência do material genético para o interior da célula alvo e a maioria dos esforços se concentra na busca de vetores eficientes que possam transportar e transferir o DNA de modo seguro e eficaz (SOMIA *et al.*, 2000). Os agentes terapêuticos responsáveis pelo transporte e liberação intracelular de genes são denominados vetores e podem ser subdivididos em duas categorias: vetores virais e vetores não virais.

1.2 Terapia gênica viral

A terapia gênica viral utiliza vetores de natureza viral como veículos transportadores do material genético terapêutico. Basicamente, vírus são organismos especializados em invadir células hospedeiras carregando seu material genético e nelas iniciar o processo de expressão gênica.

A produção de vetores virais para a terapia gênica se baseia na remoção dos genes responsáveis pelo mecanismo de multiplicação/replicação viral e dos que conferem o caráter patogênico, mantendo somente os genes necessários para a invasão das células alvo, regiões

do DNA definidas como Repetições Terminais Invertidas (ITR) que são suficientes para o ciclo de vida do vírus, com consequente inserção do gene terapêutico. Este processo ocorre graças às novas tecnologias baseadas em DNA recombinante e está representado na figura abaixo (Figura 2) (LINDEN, 2010).

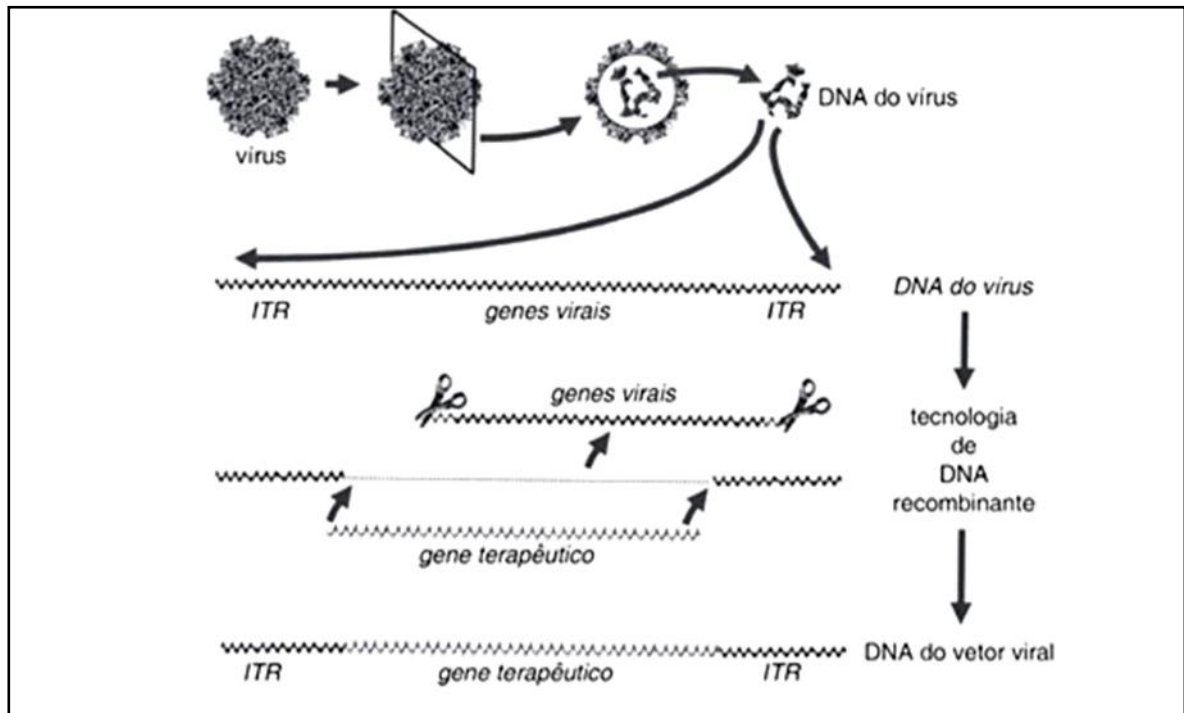


Figura 2. Construção de um vetor viral para a Terapia Gênica. Na figura, o vírus adenoassociado é utilizado como exemplo (Retirada de LINDEN, 2010).

Por possuírem esta alta capacidade de transportar e expressar o material genético exógeno em células hospedeiras (células alvo), os vetores virais são selecionados para a maioria dos testes clínicos. Entre os vetores virais mais amplamente estudados estão os vetores adenovirais, vetores retrovirais e os vetores adenoassociados. Dados compilados na base de dados da revista *"The Journal of Gene Medicine"* (www.wiley.co.uk/genmed/clinica/) mostram que aproximadamente 1370 ensaios clínicos realizados até março de 2014 utilizaram vetores virais, como veículos carreadores de material genético (Figura 3).

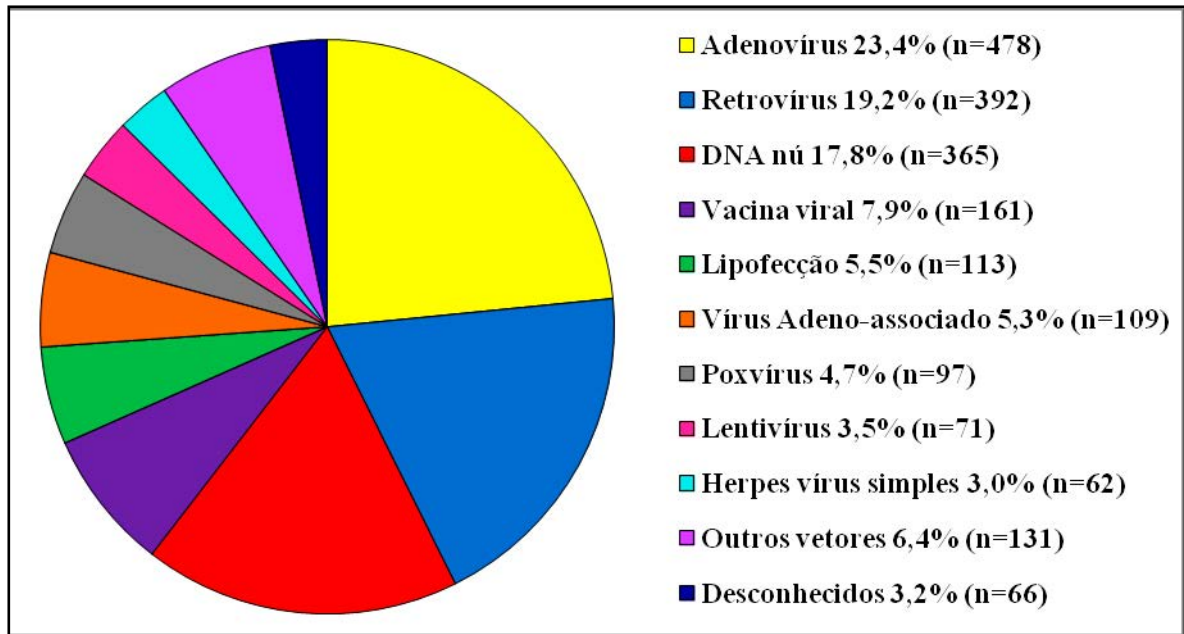


Figura 3. Vetores utilizados em ensaios clínicos. Figura adaptada de “The Journal of Gene Medicine”, março de 2014 (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>).

Ortiz e colaboradores (2012) realizaram um levantamento a respeito de patentes recentes registradas para o tratamento de câncer utilizando terapia gênica e observaram uma alta ocorrência de vetores virais como carreadores gênicos. Baseado em seu levantamento, foi possível listar (Tabela 1) as vantagens e desvantagens dos principais vetores virais utilizados na terapia gênica anti-câncer.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos principais vetores virais utilizados na terapia gênica anti-câncer.

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	Alta capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA (7-10kb) Pode infectar células não-divisíveis Infecção na maioria dos tipos de células Transferência eficiente do material genético	Alta imunogenicidade Duração limitada de expressão gênica <i>in vivo</i> Risco de replicação Limitada administração repetida
Retrovírus	Fácil preparação Bem caracterizado Atualmente utilizado em ensaios clínicos Expressão estável Alta capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA (8Kb)	Pode infectar somente células divisíveis Baixa capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA Risco de replicação Integração aleatória no genoma hospedeiro
Vírus adeno-associado	Expressão gênica não viral Pode infectar células não-divisíveis Baixa imunogenicidade Expressão gênica a longo-prazo Não patogênico Atualmente utilizado em ensaios clínicos	Baixa capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA (5 kb) Preparação fastidiosa em larga escala Eficácia reduzida de administração repetitiva
Herpes vírus	Alta capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA (25kb) Ampla gama de hospedeiros	Alta imunogenicidade Duração limitada de expressão gênica <i>in vivo</i>
Lentivírus	Pode infectar células não-divisíveis Baixa imunogenicidade Alta capacidade para inserção de fragmentos exógenos de DNA (8Kb)	Estudos insuficientes Mutagênese insercional Ingração aleatória no genoma hospedeiro

Fonte: Adaptada de Ortiz *et al.*, 2012.

Desta forma, diante dos resultados promissores envolvendo vetores virais, testes em humanos foram realizados. Em 1999, a Universidade da Pensilvânia (Filadélfia), realizou o tratamento de Jesse Gesinger, paciente que sofria de deficiência de Ornitina Transcarbamoilase (OTC), distúrbio mais comum do ciclo da uréia. Para o tratamento desta enfermidade, foi utilizado um tipo de adenovírus com deleções E1 e E4. Após quatro dias do tratamento, Gessinger morreu de falência múltipla dos órgãos. O laudo da autópsia mostrou que apesar da administração do vetor ter sido direcionada ao fígado, o principal órgão que realiza o ciclo da uréia, o vetor também foi encontrado na corrente sanguínea, e uma alta acumulação do mesmo foi encontrado no baço, linfonodos e na medula óssea, causando uma reação inflamatória grave, que levou à coagulação intravascular disseminada, dificuldade respiratória aguda e falência múltipla dos órgãos (THOMAS *et al.*, 2003).

Em 2000 um grupo de pesquisa do “Hospital Necker” de Doenças Infantis em Paris, liderado por Alain Fisher publicou o primeiro artigo referente ao sucesso no tratamento de uma doença genética, a Síndrome da Imunodeficiência Combinada Grave ligada ao cromossomo X (SCID-IX) que afeta exclusivamente homens, utilizando vetor retroviral. No entanto, um dos pacientes de Fisher não resistiu ao tratamento e o acompanhamento do quadro clínico das crianças tratadas, atualmente (2014) com idade entre 10 e 13 anos, mostrou o desenvolvimento de células T decorrente do surgimento de leucemia, resultado direto de recombinação do vetor retroviral (THOMAS *et al.*, 2003; GINN *et al.*, 2013).

Diante destes acontecimentos, apesar de os vetores virais possuírem a vantagem de serem mais eficientes como agentes de transfecção gênica, são considerados pouco seguros devido à possibilidade de mutações e recombinação, possibilidade de resposta imunitária e inflamatória, além de apresentarem limitação no tamanho do DNA plasmidial a ser incorporado e dificuldade na sua produção em grande escala (KIKUSHI *et al.*, 1999).

Desta forma, por estas questões de segurança, limitações no uso de alguns vetores virais e na tentativa de se melhorar a viabilidade da terapia gênica, novas estratégias foram desenvolvidas como alternativa aos vetores virais, dando origem a uma nova classe de vetores, os vetores não virais.

1.3 Terapia gênica não viral

As terapias viral e não viral compartilham da mesma premissa, em que graças ao sequenciamento do genoma humano e aos avanços na identificação de numerosos genes que estão envolvidos em processos celulares e doenças genéticas, foi possível a manipulação de genes com o objetivo de corrigi-los, substituí-los ou suplementá-los buscando em níveis moleculares a intervenção terapêutica. (GASCÓN *et al.*, 2013).

A introdução de material genético exógeno dentro de células alvo, para expressar o gene terapêutico, pode ser realizado utilizando vetores não virais.

Os vetores não virais apesar de serem menos eficientes do que os vetores virais quanto a capacidade de transfecção gênica, exibem algumas vantagens como fácil produção e manipulação, baixo custo e maior segurança ao paciente (MOHAN *et al.*, 2012).

Neste tipo de sistema carreador, destacam-se os polímeros, lipídeos, lipossomas, proteínas e peptídeos que possuem carga líquida positiva. O caráter catiônico do sistema

carreador propicia a interação eletrostática com as cargas negativas do DNA (grupo fosfato) formando um complexo vetor-DNA, que promove a proteção do mesmo contra a degradação, a estabilização e o mascaramento das cargas negativas do DNA incorporado (ELOUAHABI e RUYSSCHAERT, 2005).

Segundo Nardi *et al.* (2002) e Pack *et al.* (2005) o vetor ideal deve possuir algumas características altamente desejáveis para que consiga vencer as barreiras extracelulares e intracelulares e liberar eficientemente o gene de interesse no núcleo. Entre as características desejadas estão, garantir que a técnica não comprometa a saúde do paciente; ser não patogênico; possuir toxicidade desprezível e baixa imunogenicidade; proteger o DNA; expressar o material genético de forma estável; direcionar para tipos específicos de células; possibilitar o regulamento da expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade adequada; apresentar baixo custo e ser de fácil produção e manipulação.

Portanto, há mais de 20 anos, uma nova área de pesquisa foi iniciada buscando-se novos vetores não virais baseados em lipídeos e polímeros, com o objetivo de se obter as características citadas acima. Para isto, várias pesquisas focalizam a síntese de novos polímeros sintéticos, bem como a modificação de polímeros naturais visando sobrepor as barreiras inerentes a uma via específica de administração, o reconhecimento de superfícies celulares, a captação celular, a sensibilidade para responder ao pH do ambiente intracelular, o escape endossomal e portanto, desempenhar eficientemente o papel funcional do vetor (PACK *et al.*, 2005).

1.4 Vetores poliméricos utilizados em terapia gênica não viral

Inúmeros polímeros sintéticos e naturais estão sendo estudados como vetores não virais. A natureza catiônica destes carreadores possibilitam a interação eletrostática com os grupos fosfato presentes na cadeia de DNA para formar complexos polímero-DNA, os denominados poliplexos. Estes poliplexos em geral se apresentam em formas compactas e na maioria das vezes em escala nanométrica (1-1000 nm). Entre eles, destacam-se a polietilenoimina (PEI) (CHEN *et al.*, 2013), polimetacrilatos (SUN *et al.*, 2013) poliamidoamina (PAMAM) (CHEN *et al.*, 2012), quitosana (PICOLA, 2009) e Poli(L-Lisina) (BENNS *et al.*, 2000).

O PEI é um dos polímeros mais estudados em terapia gênica. PEI é produzido pela polimerização de aziridina e possui uma elevada densidade de cargas positivas devido aos

seus grupos amino protonáveis, o que lhe confere alta capacidade de tamponamento e alto escape endossomal, tornando-o um vetor promissor (GASCÓN *et al.*, 2013). Em estudos “*in vitro*” com células epiteliais da córnea humana e córnea de coelho, o PEI mostrou uma excelente liberação do transgene da β -galactosidase quando revestido por ácido hiálorônico de massa molecular inferior a 10 kDa (HORNOF *et al.*, 2008; MOHAN *et al.*, 2012). Poliplexos contendo PEI tem sido direcionados à células específicas pela conjugação de alguns ligantes, como galactose, manose, anticorpos e transferrina (PACK *et al.*, 2005). Além disso, autores reportaram melhores características do PEI por meio da inserção de poli(etileno)glicol (PEG), sendo que esta modificação aumentou a eficiência de transfecção e reduziu sua citotoxicidade. (GASCÓN *et al.*, 2013).

Polimetacrilatos são polímeros catiônicos baseados em unidades vinílicas, capazes de condensar o DNA em partículas nanométricas (GASCÓN *et al.*, 2013). Poli[2-(dimetilamino) etil metacrilato] (PDMAEMA) foi investigado quanto à influência do comprimento da cadeia polimérica na citotoxicidade, e utilizando concentrações variadas ($10\text{-}110\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) observou-se que PDMAEMA linear é citotóxico frente às células HepG2, e esta citotoxicidade aumenta à medida que a concentração do polímero e o comprimento da cadeia aumenta (CAI *et al.*, 2011; YUE e WU, 2013).

Qi e colaboradores (2009) demonstraram que dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) de geração 5 e 6 (G5 e G6) conjugados com PEG podem melhorar a eficiência de transfecção “*in vitro*” e “*in vivo*”. Recentemente, Yue Chen e colaboradores (2012) relataram a utilização do sistema de gene suicida mediado por dendrímeros de poli(amidoamina) de geração 5, G5-PAMAM-D, o qual foi eficaz na diminuição da proliferação das células PC-3, inibiu o crescimento do tumor “*in vivo*” e induziu a apoptose das células (CHEN *et al.*, 2012).

A quitosana é um polissacarídeo biodegradável, obtido por meio da desacetilação alcalina da quitina. Este biopolímero vem sendo estudado como vetor em terapia gênica e modificações em sua estrutura permitem melhorar suas propriedades físico-químicas. Quitosanas modificadas com grupos imidazol apresentaram maior capacidade de tamponamento e a solicitação de patentes referentes a este derivado modificado vem sendo requeridas (KIM *et al.*, 2008; ROY *et al.*, 2009). Wang e colaboradores (2008) mostraram que a conjugação de ácido urocânico com quitosana permite a obtenção de um derivado com uma alta taxa de transfecção comparável ao vetor comercial LipofectaminaTM 2000 (WANG *et al.*, 2008).

A LipofectaminaTM 2000 é um vetor não viral comercial baseado em lipídeo catiônico mais comumente utilizado em ensaios de transfecção gênica (CLEMENTS *et al.*, 2007).

Contendo subunidades de lipídeos catiônicos, pode formar lipossomos quando em meio aquoso, e por meio de interações eletrostáticas é capaz de interagir e complexar cadeias aniônicas de DNA, formando os denominados lipoplexos (DODDS *et al.*, 1998). Apresenta alta eficiência de transfecção e altos níveis de expressão de transgene em inúmeros tipos de células mamárias, tais como células musculares de ratos (C2C12) (DODDS *et al.*, 1998), neurônios pós-mitóticos, hepatócitos primários de ratos e células embrionárias de rim humano (H-293) (DALBY *et al.*, 2004) e células do estroma da medula óssea (BMSC) (CLEMENTS *et al.*, 2007).

Hosseinkhani e colaboradores (2013) fizeram um levantamento acerca dos polímeros sintéticos e naturais que vem sendo utilizados em estudos visando à aplicação em terapia gênica, e permitiu sumariá-los na Tabela 2.

Tabela 2. Polímeros sintéticos e naturais utilizados como vetores não virais em transfecção gênica.

Polímeros	Propriedades	Modificação química para melhorar as propriedades desejadas
PEI	Alta capacidade tamponante dentro do endossomo Protege o DNA da degradação O mais eficiente polícatión para transfecção gênica Sem limitação do tipo de células ou tecidos Sem limitação ao tamanho do DNA Apresenta toxicidade em altas quantidades de cargas positivas (altas razões N/P)	Modificação com polímeros naturais podem ser feitas para reduzir os níveis de toxicidade em altas concentrações de carga positiva Modificação com alginato e ácido hialurônico permitiu a formação de nanopartículas capazes de transfectar o DNA plasmidial
PDMAEMA	Mascara as cargas negativas do DNA e ótimo vetor para transfectar a maioria dos tipos células	Modificação com ligantes celulares específicos para direcionar a célula alvo, pode melhorar e aumentar a eficiência transfecção
PTMAEMA	Transfecção de diferentes células <i>in vivo</i> Formação de nanopartículas estáveis Tóxico em altas concentrações de cargas positivas	Modificação com polímeros naturais podem ser feitas para reduzir os níveis de toxicidade
DEAE-dextrana	Biocompatível e atóxico para muitas células e tecidos	Fácil modificação com ligantes específicos devido à presença de vários grupos funcionais permitindo a transferência gênica

Quitosana	Não imunogênico Capaz de introduzir grandes cadeias de genes dentro da célula alvo Forma nanopartículas homogêneas estáveis Baixa solubilidade em água e condições fisiológicas	Modificação dos grupos funcionais de quitosana permitem fortalecer interações entre o polímero e a superfície de células e proteínas. Quitosanas modificadas com ácido succínico tiveram sua solubilidade em água e condições fisiológicas aumentadas
Dextrana	Facilmente modificado por conjugação com grupos amina primários Amplamente usado em terapia gênica de câncer Capaz de transfectar células <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Modificação com espermina foi citada como um excelente caminho para melhorar a eficiência de transfecção
Ácido Hilauriônico	Aquo-solúvel com grande capacidade de transportar genes Apresentou maior transfecção que o PEI e menor citotoxicidade quando utilizado sozinho. Terapia gênica em humanos foi aplicada com nanopartículas de quitosana com ácido hilauriônico em epitélio da córnea humana	A modificação de polímeros sintéticos como PEI e Poli(L-Lisina) com ácido hilauriônico pode aumentar a eficiência de expressão gênica

Fonte: Adaptada de Hosseinkhani *et al.*, 2013

Uma das principais características de todos os vetores baseados em polímeros catiônicos é a alta densidade de carga positiva, que torna possível condensar cadeias de DNA (carregadas negativamente) devido a atrações eletrostáticas, formando os chamados poliplexos. Estudos tem demonstrado que poliplexos são captados pela membrana celular via endocitose, como detalhado na Figura 4.

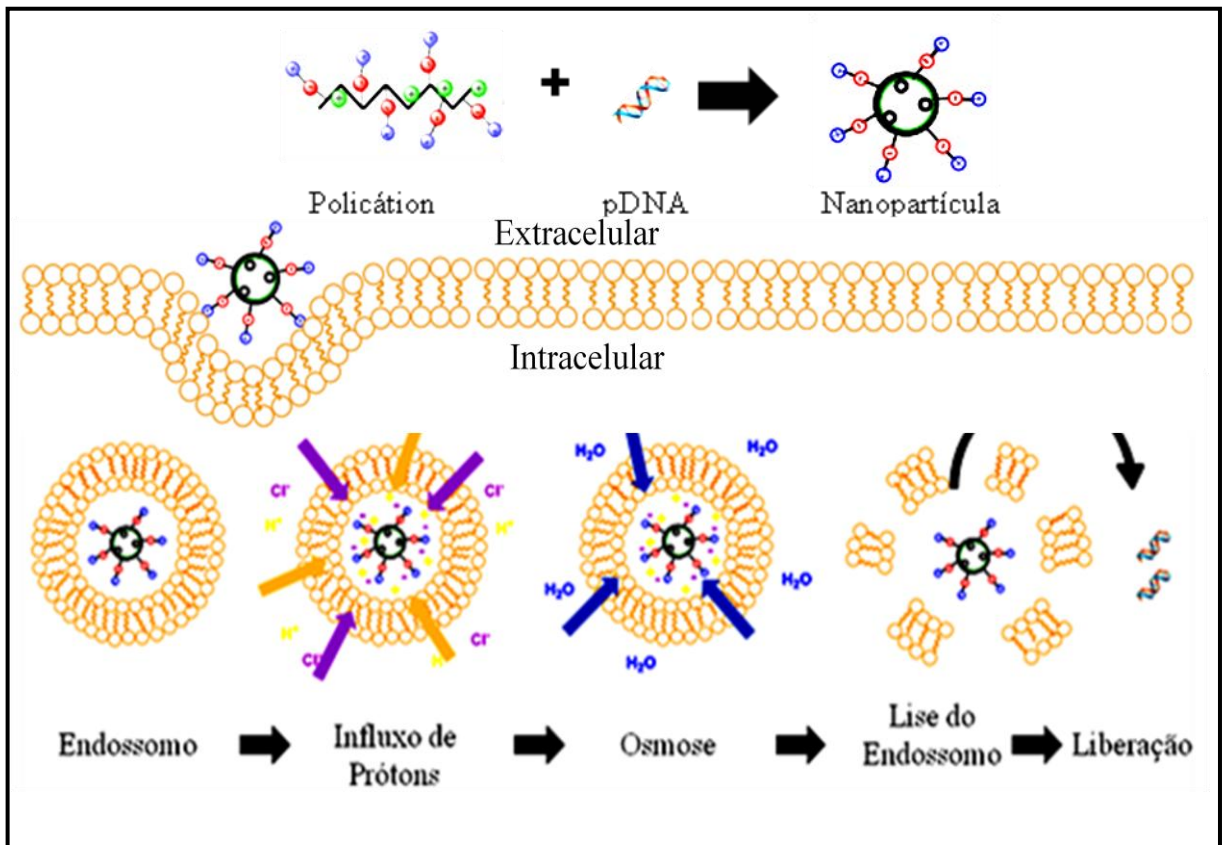


Figura 4. Representação esquemática do processo de endocitose, formação do endossomo e mecanismo de liberação intracelular de pDNA pelo mecanismo “esponja de prótons”.

A Figura 4 ilustra as etapas envolvidas na captação celular e a consequente transfecção do DNA mediada por polímeros. Entretanto o rompimento do endossomo e o escape do DNA ainda é um mecanismo não esclarecido.

Entre as propostas de como ocorre o escape endossomal, o mecanismo mais aceito é o denominado “esponja de prótons”. Este mecanismo foi proposto inicialmente por Boussif e colaboradores (1995) para explicar a alta taxa de transfecção do PEI. Esta alta taxa de transfecção é atribuída a sua elevada capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH, resultado da presença de grupos amino protonáveis. Sendo assim, polímeros presentes no endossomo podem absorver os prótons que são bombeados para dentro desta organela, e devido à protonação e consequentemente a repulsão dos grupos amino protonados, ocorre o intumescimento do polímero. Além disso, para evitar um aumento da densidade de cargas dentro do endossomo ocasionado pelo fluxo de prótons, ocorre também um fluxo equivalente de íons cloreto (Cl⁻). A entrada de ambos, prótons e íons cloreto, aumenta a osmolaridade do endossomo e causa uma maior absorção de água. A combinação do intumescimento do

polímero e do inchamento osmótico do endossomo leva a desestabilização do mesmo e resulta no seu rompimento, com consequente liberação do seu conteúdo no citoplasma (BOUSSIF *et al.*, 1995; FUNHOFF *et al.*, 2004).

1.5 Poli(L-Lisina)

A Poli(L-Lisina) (PLL) (Figura 5) foi um dos primeiros polímeros estudados para a liberação de genes (ELIYAHU *et al.*, 2005). Possui unidades repetitivas do aminoácido lisina, unidos por ligações peptídicas, portanto é biodegradável, propriedade que a torna especialmente adequada para uso “*in vivo*”. Entretanto o polímero exibe uma toxicidade considerada de modesta a alta (LUTEN *et al.*, 2008).

Nos últimos cinco anos, novas estratégias tem sido adotadas a fim de se melhorar as propriedades da PLL, entre elas modificações em sua estrutura (MIYATA *et al.*, 2008) e a utilização de ligantes para receptores celulares (BARATI *et al.*, 2006; NIE *et al.*, 2009). Outras alternativas que vem sendo utilizadas são a ligação de grupos endossomolíticos à PLL para aumentar a liberação intracelular (SHIM e KWON, 2010).

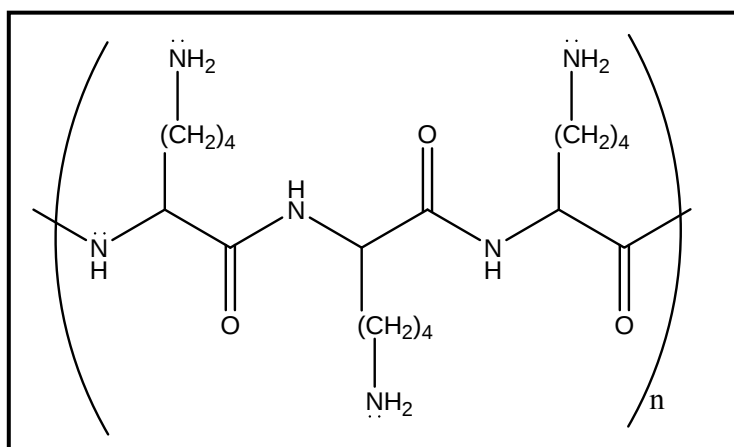


Figura 5. Estrutura química do polímero PLL.

Neste tema, Zhang e colaboradores (2010) relataram que nanopartículas baseadas em PLL (PLL_{RP}), utilizando o vetor plasmidial SPT7pTL que expressa o fator de transcrição nuclear humano SPT7 e o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), são eficientes

na transfecção gênica em células B16-F1, concomitantemente a estimulação da síntese da melanina.

Nanopartículas de PLL conjugada com ácido palmítico (PA) foram eficazes na transfecção de DNA plasmidial em células estromáticas da medula óssea, e apresentaram melhor performance quanto à proteção do DNA por nucleases do que a formulação comercial LipofectaminaTM2000. Além disso, em alguns casos a eficiência de transfecção de PLL-PA foi da ordem de 2 a 5 vezes maior que a eficácia da LipofectaminaTM2000 (CLEMENTS *et al.*, 2007).

A conjugação de PLL com PEG proporciona a estabilização estérica da nanopartícula e previne a agregação e interação da mesma com proteínas do soro fisiológico. Nanopartículas compostas por copolímeros tri-bloco: poli(ácido láctico) (PLA), poli(etileno glicol) e Poli(L-Lisina) (PLA-PEG-PLL) foram capazes de proteger o DNA da degradação por nucleases, mostraram-se praticamente atóxicas e apresentaram eficiências de transfecção superiores aquela exibida por PEI (FU *et al.*, 2011). Já a combinação de asialoorosomucoide (AsOR) com PLL tem sido utilizada para tornar a nanopartícula sítio-dirigida à hepatócitos via receptores asialoglicoproteína (ASGPr) (KWOH *et al.*, 1999).

Desta forma, a modificação da superfície da PLL é um fator determinante para a eficiência da terapia gênica, a fim de proporcionar menor citotoxicidade e prolongar o tempo de permanência do nanocarreador na corrente sanguínea até atravessar a membrana da célula alvo, e possuir compatibilidade tal que, não seja removido por macrófagos do sistema retículo endotelial do fígado, baço e outros órgãos (PEPPAS *et al.*, 2004). A obtenção de novos polímeros com camadas protetoras na superfície das nanopartículas pode evitar interações com proteínas plasmáticas e fagócitos, prolongando o tempo de circulação na corrente sanguínea (LEONG *et al.*, 1998; SATO *et al.*, 2001).

1.6 Fosforilcolina gliceraldeído

Moléculas de fosfolípidos são típicos componentes da membrana celular. Particularmente, o grupo zwitteriônico fosforilcolina (PC) (Figura 6) é encontrado naturalmente na camada externa de biomembranas. A inserção do grupo PC promove uma configuração biomimética ao vetor, através da formação de uma barreira de hidratação termodinâmica sobre a superfície do nanocarreador devido a grande natureza hidrofílica do

PC. Como consequência, a adsorção por proteínas plasmáticas e fagócitos é diminuída e a compatibilidade das nanopartículas com o sangue é melhorada. Adicionalmente, a inserção de PC na cadeia polimérica, evita respostas inflamatórias e propicia a estabilidade estérica dos complexos formados com o DNA (LAM *et al.*, 2004; IWASAKI e ISHIHARA, 2005; PICOLA, 2009; AHMED *et al.*, 2012). Assim, vetores contendo PC podem ter suas citotoxicidades diminuídas e suas hemocompatibilidades aumentadas.

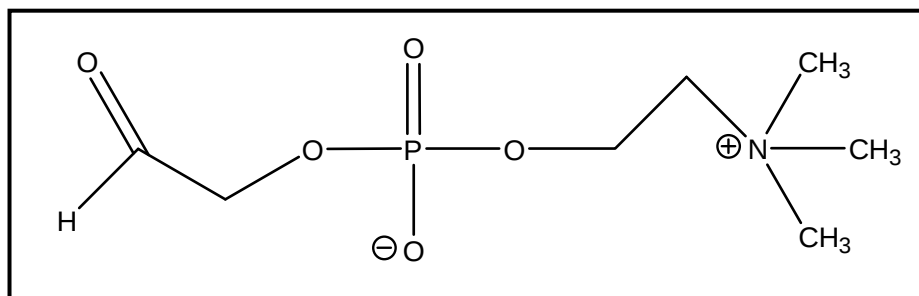


Figura 6. Estrutura química do grupo substituinte fosforilcolina gliceraldeído (PC).

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a introdução de grupos fosforilcolina em quitosana, além de resultar na formação de um grupo amino secundário, aumenta a solubilidade e estabilidade das nanopartículas formadas com os derivados. Os grupos PC permitem aumentar a estabilidade coloidal das nanopartículas em pH fisiológico, bem como o escape endossomal do DNA plasmidial com um aumento na eficiência de transfecção (PICOLA, 2009).

Estudos envolvendo o polímero metacriloiloxietil-fosforilcolina (MPC) demonstraram que a presença de fosforilcolina impede a adsorção de proteínas e adesão de plaquetas e células, desta forma, evita a trombogenicidade tornando-o mais hemocompatível, segundo o mecanismo proposto a seguir (Figura 7) (IWASAKI e ISHIHARA, 2005).

Lam e colaboradores (2004) propuseram um novo modelo de carreador gênico baseado em copolímeros em bloco, o [2-(dimetilamino)etil metacrilato-2-(metacriloiloxietil fosforilcolina)] (DMAEMA-MPC) e obtiveram um novo sistema carreador que foi capaz de condensar o DNA eficientemente, formando complexos compactos com estabilidade estérica e com baixo nível de interação celular não-específica.

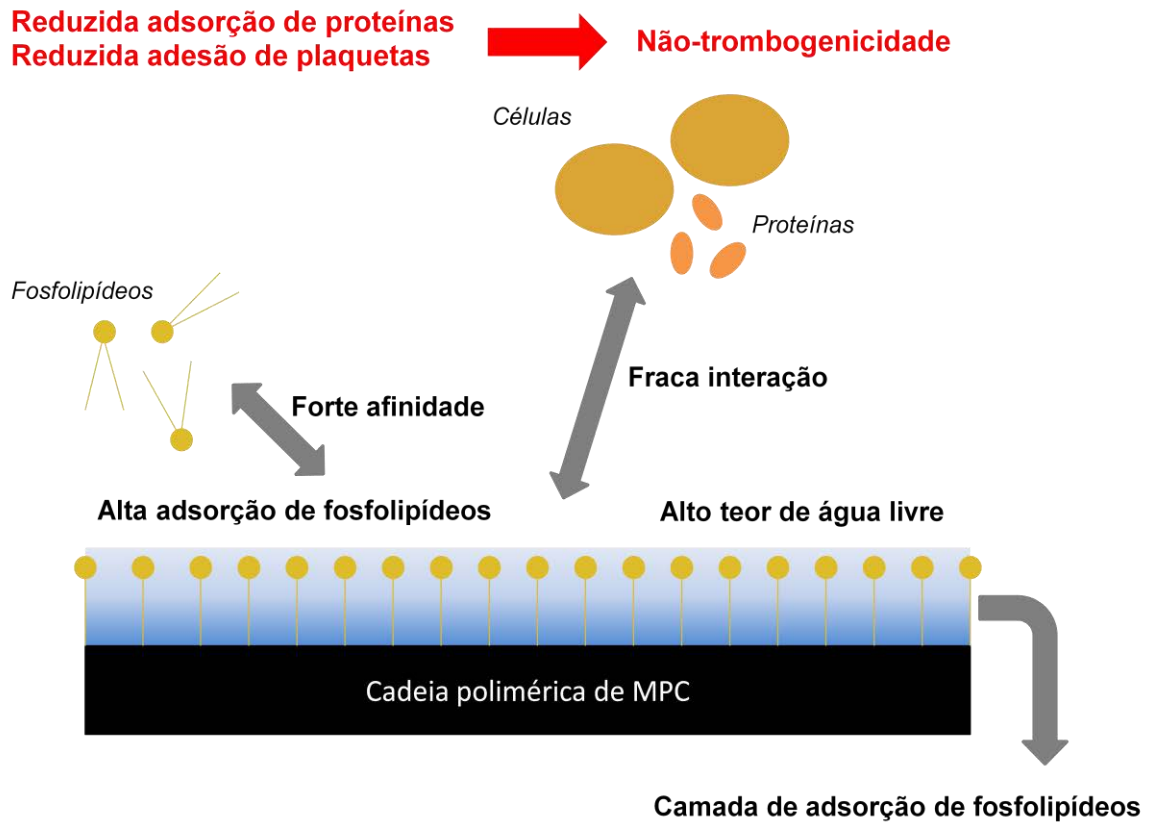


Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de não-trombogenicidade observado para o polímero MPC. (Adaptado de IWASAKI e ISHIHARA, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo a síntese de derivados de Poli(L-Lisina) contendo proporções crescentes do grupo fosforilcolina, visando sua aplicação como sistemas para a transferência gênica. A execução da proposta inclui avaliar o efeito do grau de substituição nas propriedades das nanopartículas formadas por meio da interação com o DNA plasmidial, tais como tamanho, estabilidade coloidal, biocompatibilidade e eficiência de transfecção “*in vitro*”.

2.2 Objetivos específicos

i) Síntese e caracterização de derivados de Poli(L-Lisina) contendo proporções crescentes do grupo fosforilcolina.

ii) Estudo da formação, estabilidade e propriedades das nanopartículas, utilizando-se o plasmídeo VR 1412 que contém o gene da beta-galactosidase, variando-se os parâmetros: pH e razão de cargas (N/P) (grupos amino (PLL) por grupos fosfato do pDNA).

iii) Estudos de citotoxicidade e transfecção “*in vitro*” utilizando-se os derivados obtidos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados para a elaboração deste trabalho foram os seguintes: Ácido acético glacial (Synth), Ácido clorídrico (Chemco), Agarose (Aldrich Chemical Co), Borocianohidreto de sódio (Fluka), Cloreto de deutério (Aldrich Chemical Co), Hidróxido de sódio (Synth), Periodato de sódio (Synth), Poli(L-Lisina) (Alamanda Polymers – Mw 41000 Da), S,n glicero-3-fosfocolina (Bachem). As membranas de diálise utilizadas para a purificação do polímero modificado possuem tamanho de exclusão de 12000 Da (Spectra Pore[®]/Dyalysis). O DNA plasmidial VR1412 que codifica o gene da β -galactosidase (β -gal) com o promotor Citomegalovírus (CMV) e tamanho de 8,100 kb foi fornecido pela Vical Inc (San Diego, CA, EUA). Para amplificação e purificação do plasmídeo o Kit QIAGEN[®] foi utilizado. Para os testes de viabilidade celular utilizou-se o kit CellTiter96[®] (Promega Corporation). Os testes de eficiência de transfecção foram realizados utilizando o kit ELISA para β -gal (ROCHE) e a para a quantificação das proteínas totais o kit baseado no ácido bicinconínico (BCA) foi utilizado (Thermo Scientific).

3.2 Síntese de fosforilcolina gliceraldeído

Para a preparação de fosforilcolina gliceraldeído (PC), seguiu-se o procedimento descrito em Picola (2009). Inicialmente, solubilizou-se 7 gramas de s,n glicero-3-fosfocolina (MM 257,22 g/mol) em 100 mL de água (H₂O), obtendo-se uma solução 0,07 g.mL⁻¹ que foi resfriada em banho de gelo. Sob agitação gotejou-se 50 mL de uma solução 0,956 mol.L⁻¹ de periodato de sódio (NaIO₄, MM 213,89 g/mol). A mistura reacional foi deixada sob agitação por 5 horas. Em seguida, a solução resultante foi congelada, para posteriormente ser liofilizada. O sólido obtido após a liofilização foi solubilizado em 100 mL de metanol (MeOH) gelado e colocado em banho de gelo, a fim de se precipitar o NaIO₄ excedente e garantir maior remoção deste sólido insolúvel por filtração. O MeOH foi removido da solução

por destilação a pressão reduzida em rotaevaporador por aproximadamente 90 minutos à temperatura de 30 °C, até obter-se um líquido viscoso.

A massa de PC obtida foi de 5,306 g e foi solubilizada em 16 mL de MeOH e 7,8 mL de H₂O, obtendo-se uma solução estoque de PC equivalente a 0,989 mol.L⁻¹.

O grupo substituinte, fosforilcolina gliceraldeído, foi posteriormente caracterizado por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de ¹H) e espectroscopia de infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR).

3.3 Síntese dos derivados

A proposta de modificação no polímero, Poli(L-Lisina) (PLL) com o grupo PC, tem como objetivo introduzir grupos amino secundários em sua estrutura, para proporcionar maior capacidade de tamponamento e diminuir a citotoxicidade das nanopartículas, que provavelmente poderá aumentar a eficiência de transfecção.

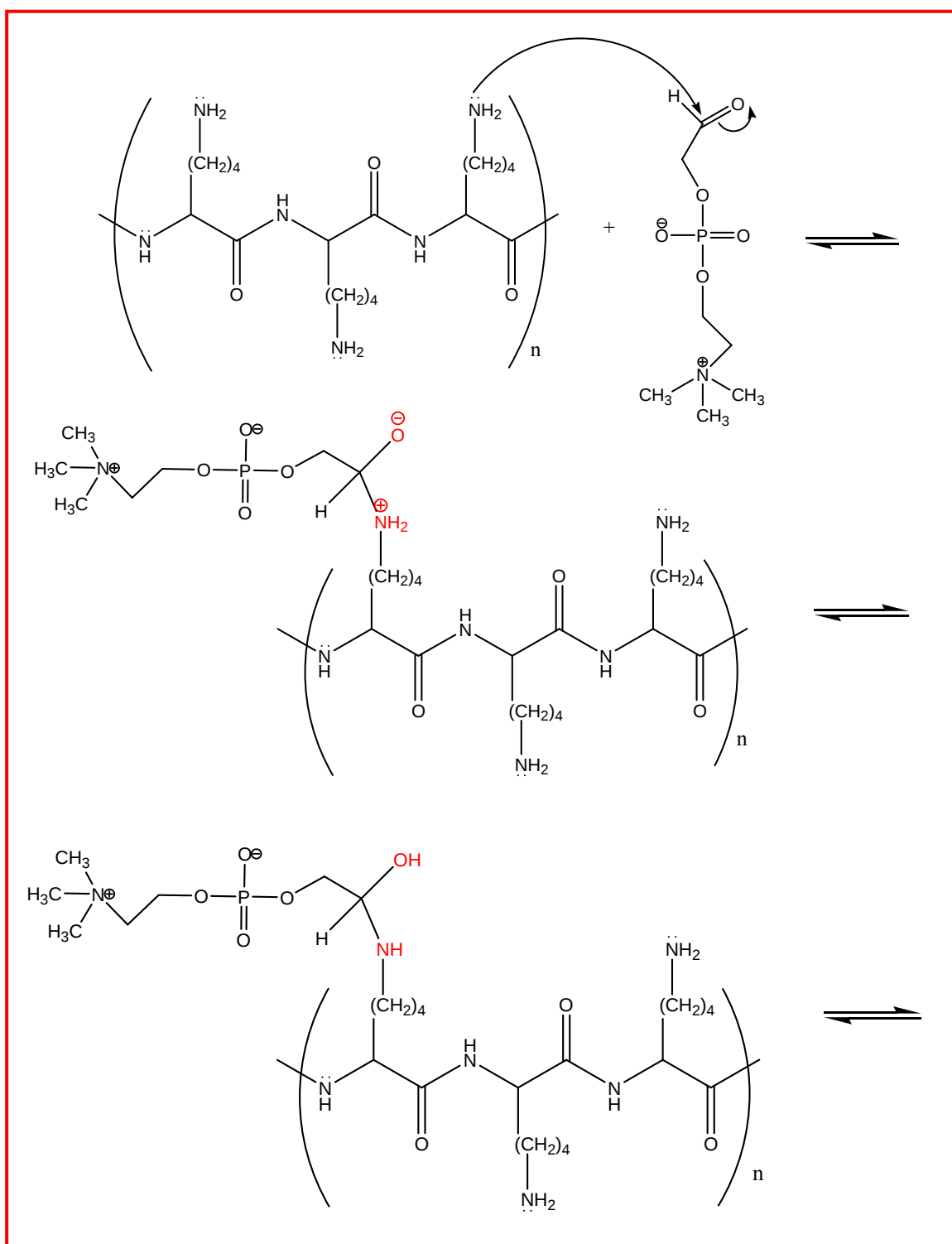
Os derivados foram preparados segundo o procedimento descrito em Tiera *et al.* (2006), pesando-se 0,5 g de PLL, e solubilizando-a em 20 mL de solução aquosa de ácido acético (H₃CCOOH) 2% em massa. A solução foi colocada em banho de gelo, para que a temperatura da reação fosse mantida a 0 °C. O grau de substituição foi controlado, variando-se o volume da solução estoque de PC. Uma alíquota da solução estoque de PC foi diluída em 10 mL de MeOH e gotejada lentamente sobre a solução de PLL a 0 °C sob agitação vigorosa, permanecendo com agitação e nesta temperatura por 30 minutos.

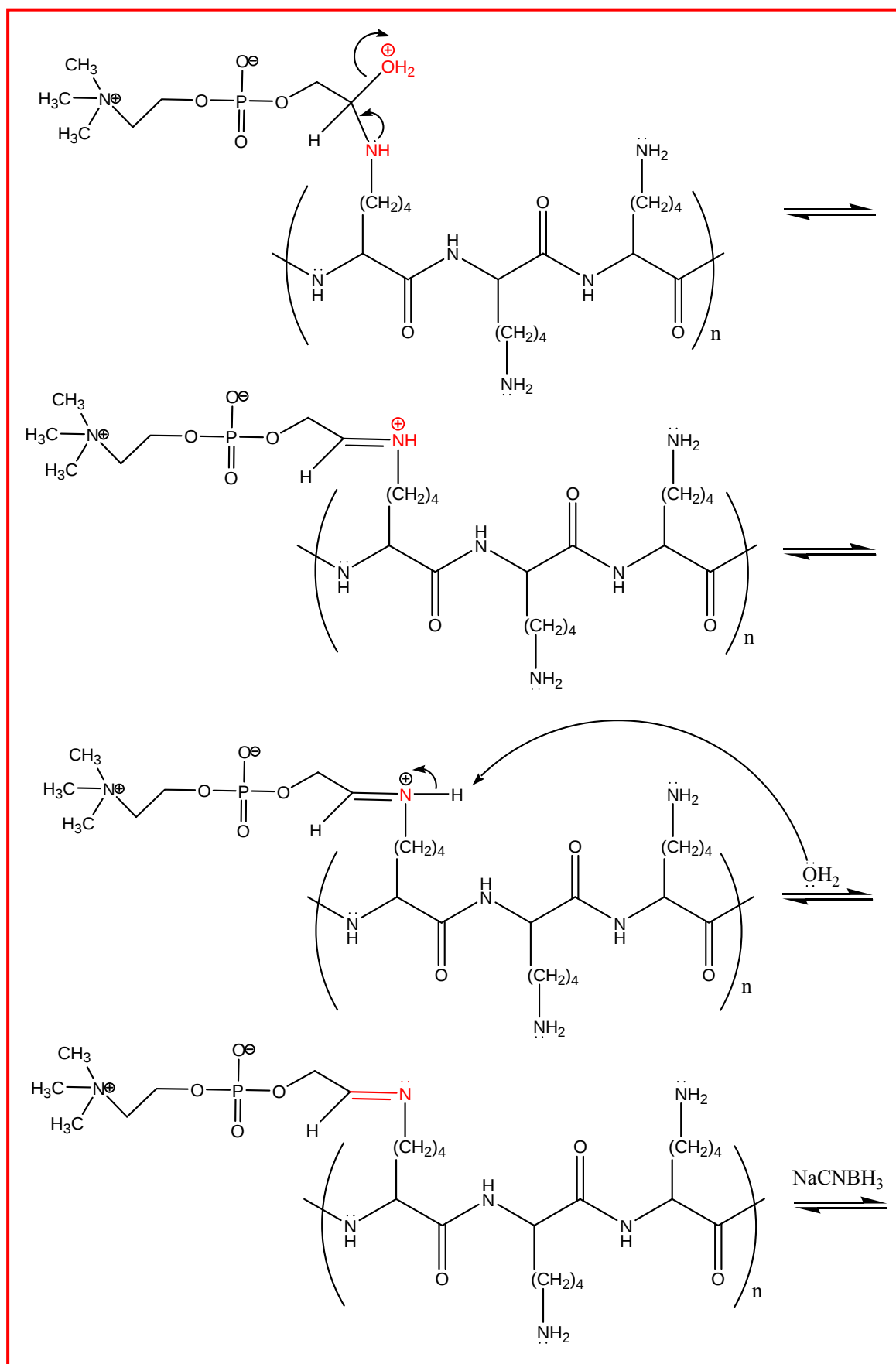
Em seguida o pH da mistura reacional foi ajustado para 6,5 com solução diluída de hidróxido de sódio (NaOH) e deixado reagir por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação.

Após uma hora, a solução foi resfriada a 0 °C e adicionou-se 10 mL de uma solução de borocianidreto de sódio (0,8 mol.L⁻¹). A solução resultante foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 20 horas.

O polímero foi purificado por diálise, utilizando-se membranas de 12000 Da, inicialmente contra água por dois dias, contra NaOH (0,05 mol.L⁻¹) por um dia, contra HCl (0,01 mol.L⁻¹) por 2 dias, e novamente contra H₂O por dois dias. O polímero foi congelado e liofilizado, para posterior caracterização.

A reação de PLL com PC envolve uma reação de adição nucleofílica à carbonila do grupo substituinte fosforilcolina gliceraldeído, seguido da formação de imina (ou também denominada Base de Schiff) e de um rápido equilíbrio que leva a redução da dupla ligação da base de Schiff e a formação da ligação covalente simples, obtendo-se o derivado PLL-PC, conforme o mecanismo a seguir (Figura 8).





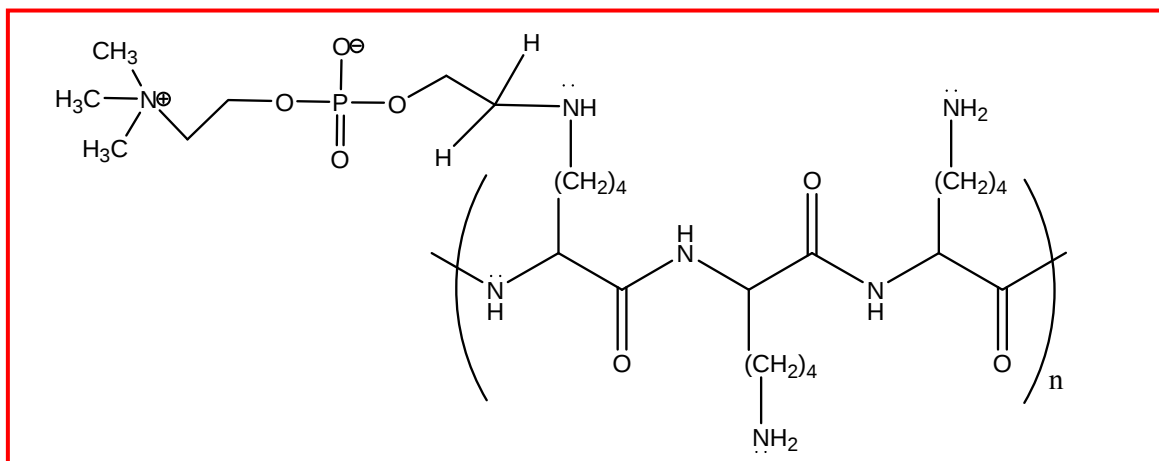


Figura 8. Mecanismo da síntese de modificação da PLL com PC via aminação-redutiva.

3.4 Caracterização dos derivados de PLL modificados com fosforilcolina (PLL-PC)

3.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Espectroscopia Infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

Os derivados foram caracterizados utilizando-se a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) a 25 °C, solubilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra em 1 mL de $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (100:1). As medidas foram realizadas em um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear da Bruker de 500 MHz no Laboratório Multi Usuário da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras - USP de Ribeirão Preto-SP. Os espectros na região do infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foram realizados em um espectrofotômetro modelo Spectrum UATR Two – Perkin Elmer®, sem preparo prévio da amostra. Este equipamento mede as variações que ocorrem quando um feixe de radiação infravermelha é totalmente refletido em uma amostra, alocada sobre a superfície de um cristal opticamente denso com um elevado índice de refração, que neste caso foi o diamante. As medidas foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica, Química Analítica e Bio-inorgânica – (Ibilce/UNESP) do Prof. Dr. Maurício Boscolo.

3.5 Determinação do grau de substituição por RMN de ^1H

Os graus de substituição (% GS) foram determinados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) a partir da identificação dos prótons correspondentes a PLL e ao grupo PC. As porcentagens de substituição foram determinadas utilizando-se a equação 1 (abaixo), sendo que, H_2 corresponde à área do sinal dos hidrogênios dos grupos metilas do trimetilamônio do grupo PC, e H_1 corresponde à área do sinal dos dois hidrogênios ligados ao carbono γ da cadeia lateral da PLL (Figura 9).

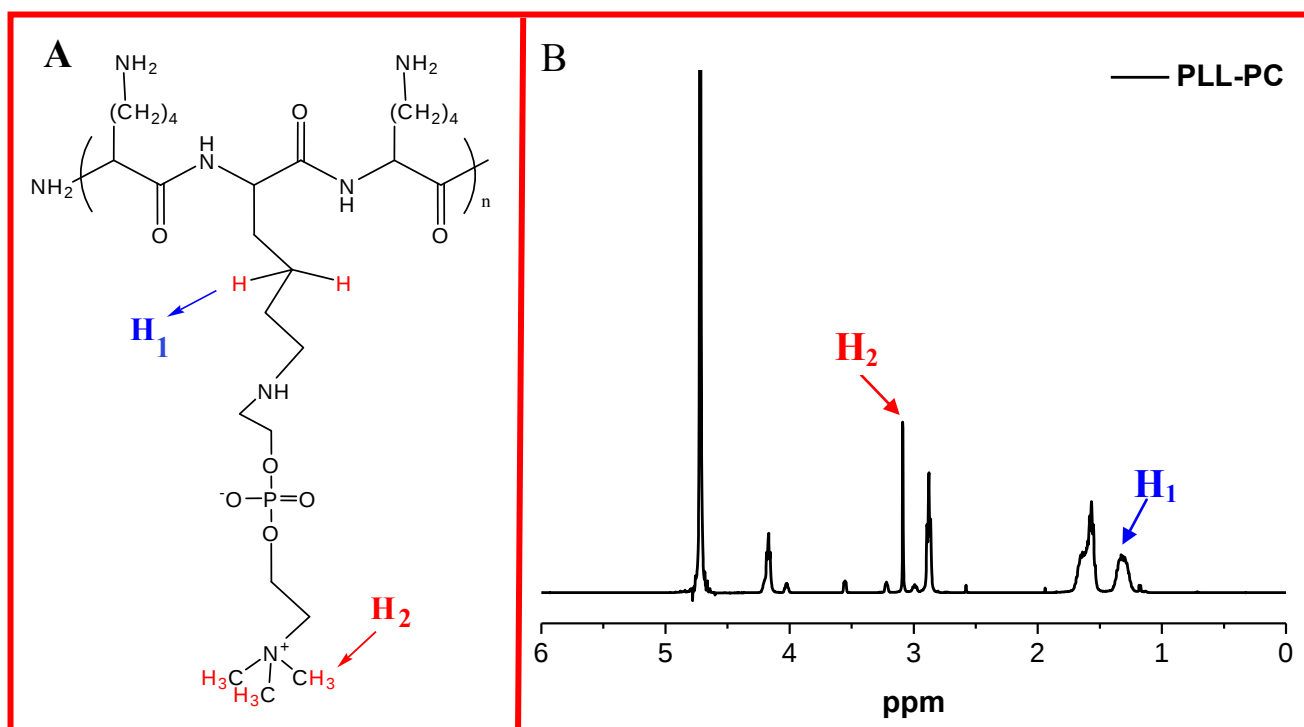


Figura 9. (A) Estrutura dos derivados de PLL-PC: hidrogênios utilizados na determinação do grau de substituição em vermelho. (B) Espectro de RMN de ^1H do derivado PLL-PC7,5%.

Portanto, utilizando a equação abaixo, determinou-se o % GS:

Equação 1

$$\% GS = \left(\frac{\frac{H_2}{9}}{\frac{H_1}{2}} \right) \times 100$$

3.6 Determinação do grau de substituição por potenciometria

Os graus de substituição também foram determinados por potenciometria, tendo como base o método de Muzzareli (MUZZARELI, 1977). Neste método, aproximadamente 40 mg de polímero foi previamente solubilizado em solução aquosa de HCl 0,1 mol.L⁻¹, seguida da titulação com NaOH 0,0955 mol.L⁻¹ padronizado. A cada adição de base o pH foi registrado em pHmetro digital (Digimed). A primeira derivada da curva de pH em função do volume de NaOH foi utilizada para determinação do volume de NaOH necessário para total desprotonação dos grupos amino. Assim, o cálculo para a determinação do grau de substituição foi feito por meio da equação 2:

$$\%GS = \left(\frac{n^{\circ} \text{ mols PLL substituída}}{(n^{\circ} \text{ mols substituída} + n^{\circ} \text{ mols PLL não substituída})} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

3.7 Determinação da massa molar e polidispersividade dos polímeros por cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar das amostras de PLL e seus derivados sintetizados foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), que se baseia na separação do polímero por tamanho molecular. As medidas foram realizadas em um cromatógrafo líquido HPLC Shimadzu LC-20 equipado com detector de índice de refração Shimadzu RID-10A. Duas colunas em série (SB-803 HQ e SB-805- SHODEX) foram utilizadas na separação e análise das amostras. O conjunto de padrões monodispersos possui massa molar no intervalo de 6200 a 805000 Da. As corridas foram realizadas a 35 °C tendo como eluente a solução tampão ácido acético/acetato de sódio (0,3 mol.L⁻¹/0,2 mol.L⁻¹) pH 4,5 com fluxo de 0,8 mL por minuto, e concentração do polímero de 5 mg.mL⁻¹. As análises foram realizadas no Lab. de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) em colaboração com a Prof^ª. Dr^ª. Carla Cristina Schmitt Cavaleiro.

3.8 Determinação da capacidade de tamponamento

A capacidade tamponante da PLL e seus derivados foi determinada por titulação ácido base, utilizando o procedimento descrito por LU *et al.* (2008). Os polímeros previamente solubilizados em solução aquosa de cloreto de sódio 150 mmol.L^{-1} foram titulados com solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até atingir o pH 12. Em seguida titulou-se novamente com uma solução de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2.

3.9 Amplificação e purificação do plasmídeo (pDNA)

O plasmídeo VR1412, contendo o gene da β -galactosidase (β -gal) e o promotor Citomegalovírus (CMV) com tamanho de 8,100 kb, foi obtido da VICAL Inc. (San Diego, CA, USA) e amplificado com a bactéria *Escherichia coli* (DH5 α) e purificado utilizando-se o Mega kit QIAGEN de acordo com a instrução do fabricante. O plasmídeo purificado foi avaliado via eletroforese em gel de agarose (1%) e sua concentração determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop® 3300 (Thermo Science) em 260 nm como previamente descrito (CASÉ *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.10 Preparação de nanopartículas poliméricas com pDNA por coacervação

O procedimento mais utilizado para a preparação de nanopartículas envolvendo polímeros catiônicos e pDNA é a coacervação do complexo. Neste procedimento as soluções do polycation e pDNA são preparadas separadamente, pela dissolução na solução tampão apropriada a temperatura ambiente. Soluções dos polímeros são injetadas na solução contendo pDNA sob agitação intensa e a quantidade do polycation pode ser variada para obtenção de diferentes razões N/P (razão de mol de grupos amino (polímero) por mol de grupos fosfato (pDNA)).

3.11 Avaliação da estabilidade e tamanho das nanopartículas em função de diferentes condições experimentais

3.11.1 Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados utilizando-se o ensaio com Brometo de Etídio

A interação entre o pDNA (DNA plasmidial: VR1412) e os polímeros, foi avaliada utilizando-se o ensaio de decaimento de fluorescência da sonda catiônica Brometo de Etídio (EtBr). O ensaio baseia-se no monitoramento da fluorescência de EtBr intercalado entre as bases da cadeia de pDNA. A adição de PLL e seus derivados à solução contendo pDNA e EtBr desloca as moléculas de EtBr para o meio aquoso, o que causa um decréscimo na intensidade de fluorescência. O ensaio é representado na figura abaixo (Figura 10).

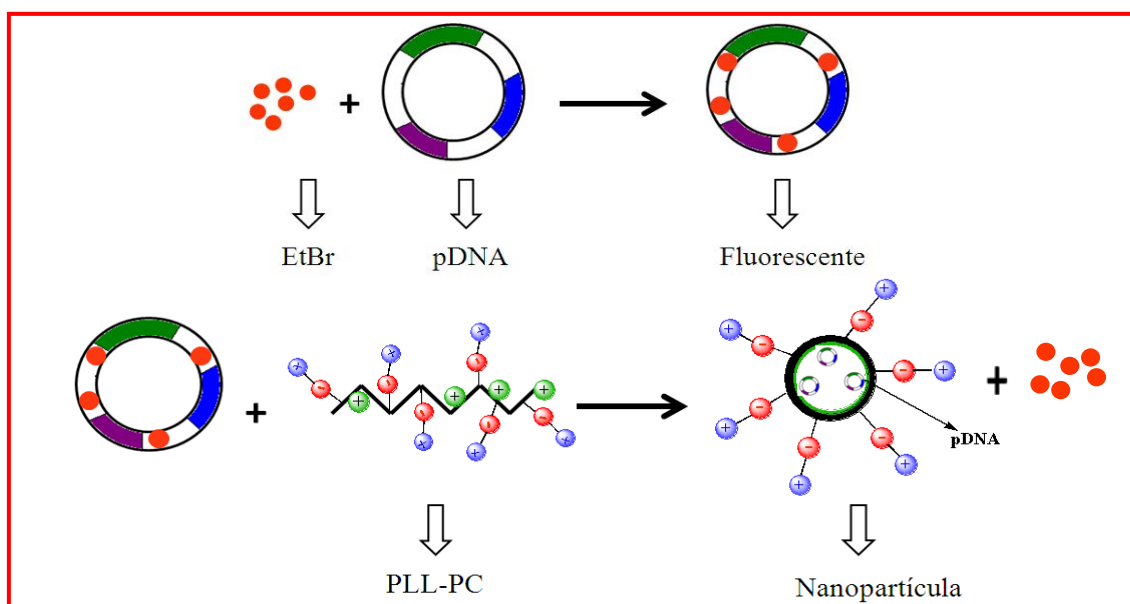


Figura 10. Representação esquemática do ensaio com EtBr em meio aquoso para estudo da interação de PLL e seus derivados com pDNA.

Neste estudo, preparou-se uma solução estoque de aproximadamente $7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ do polímero em solução tampão de pH desejado, sendo que as soluções tampão utilizadas neste ensaio consistiam de tampão acetato (50 mmol.L^{-1} , força iônica 150 mmol.L^{-1} e pH 5,0) e tampão fosfato (50 mmol.L^{-1} , força iônica 150 mmol.L^{-1} e pH 7,4). A solução de pDNA foi

preparada na concentração de $16 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de grupos fosfato e a de EtBr em $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução tampão de pH desejado. As medidas de fluorescência foram realizadas em fluorímetro Hitashi F4500, com comprimento de onda de excitação de 560 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada em 605 nm. A temperatura foi mantida constante a 25°C , por meio de banho termostatzado durante todo o experimento. A solução contendo pDNA-EtBr foi titulada com a solução do polímero, e registrou-se o decaimento da intensidade de fluorescência. Os ensaios para todos os polímero em cada pH investigado foram feitos em duplicata. Posteriormente, construiu-se um gráfico de % de fluorescência relativa em função da razão de grupos amino do polímero (N) por grupos fosfato de DNA (P) (Razão N/P).

3.11.2 Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose permite avaliar a estabilidade dos complexos formados em função do grau de substituição, razão N/P e pH, a partir da análise da mobilidade do pDNA na matriz de gel, quando esta é submetida a um campo elétrico. A molécula de pDNA possui carga negativa então tende a migrar para o pólo positivo, enquanto que à medida que os poliplexos vão sendo formados, a interação eletrostática entre o pDNA e os polímeros catiônicos começa a ser tão significativa que todo o pDNA fica complexado e não se visualiza a migração do mesmo em direção ao pólo positivo.

A cuba de eletroforese horizontal foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron. Os complexos foram formados a diferentes razões N/P (0,25; 0,5; 1; 3 e 6), para uma concentração fixa de pDNA ($70 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e foram incubados nos tampões apropriados (dependendo do pH avaliado) na força iônica de 150 mmol.L^{-1} por 30 minutos. As amostras foram adicionadas nos poços do gel de agarose 1% e a corrida foi realizada em tampão TAE 1x por 70 minutos a 75 V. Após a corrida da eletroforese o pDNA foi revelado incubando-se os géis em água destilada contendo brometo de etídio ($1 \mu\text{g/mL}$) por 2 minutos e revelado no Lab. de Evolução Molecular de Insetos da Prof. Dr^a. Claudia Carareto (Ibilce-UNESP) no aparelho UVtransiluminator com máquina fotográfica conectada ao computador e interligada ao programa Alpha Digital.

3.11.3 Espalhamento de luz dinâmico e medidas de potencial zeta

Os tamanhos das partículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico com o aparelho Zetasizer nano-ZS90 (Malvern Instrument Worcestershire, UK), equipado com laser de 633 nm e ângulo de 90° do Laboratório de Polímeros (Ibilce-UNESP) em colaboração com o Prof. Dr. João Ruggiero Neto.

As nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA foram preparadas em diferentes razões N/P (0,25; 0,5; 1; 3 e 6) em tampão apropriado (dependendo do pH avaliado) e força iônica 150 mmol.L⁻¹ por meio da titulação da solução de pDNA (60 µmol.L⁻¹) com as soluções dos diferentes polímeros. As medidas foram feitas em duplicata com três acumulações. As mesmas soluções foram utilizadas nas medidas de potencial zeta.

3.12 Estudos de citotoxicidade e transfecção “*in vitro*”

3.12.1 Estudo da citotoxicidade dos polímeros

Os estudos de citotoxicidade e transfecção “*in vitro*” foram realizados utilizando-se células de carcinoma cervical HeLa (FR-positivo) (America Type Culture cell Collection/Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas em frasco de cultura contendo o meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina (PS) em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂ a 37 °C.

Inicialmente as células HeLa em meio DMEM suplementado foram transferidas para placa de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço e incubadas por 24 horas em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂ a 37 °C. Após 24 horas, trocou-se o meio por novo meio DMEM suplementado e posteriormente adicionou-se alíquotas da solução dos polímeros avaliados (cuja concentração das soluções estoques dos polímeros são equivalentes a 1,0 mg.mL⁻¹, preparadas em tampão fosfato pH 6,3 e força iônica 150 mmol.L⁻¹) e LipofectaminaTM2000 (LP), de forma que as concentrações finais em cada poço foram 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg.mL⁻¹, sendo cada concentração repetida em três poços e incubando-se novamente a placa por 24 horas. No último dia as células expostas a diferentes

concentrações de polímeros foram analisadas por meio da determinação da viabilidade celular utilizando o ensaio de CellTiter96[®] aquoso não adioativo de proliferação celular (Promega Corporation), que consiste na combinação dos compostos 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) e fenazina metasulfato (PMS). Assim, o meio de cultura da placa foi removido e trocado por meio DMEM suplementado contendo MTS e PMS, na proporção de 20 µL de meio : 100 µL de MTS/PMS (por poço), e incubou-se a placa por 30 minutos a 37 °C em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂. O composto MTS pode ser biorreduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial, encontrada em células metabolicamente ativas, em sais de formazan que são solúveis em meio de cultura, e consequentemente provocam o aparecimento de cor púrpura à solução. Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados, e quantificado pela leitura da densidade ótica em 490 nm com um leitor de microplaca EL800 universal (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, EUA), e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células sem exposição ao polímero (controle celular) como 100%.

3.12.2 Estudo da citotoxicidade das nanopartículas

Os estudos de citotoxicidade das nanopartículas foram executados da mesma forma como descrito pelo item 3.12.1, de forma que as células são inicialmente cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço e incubadas por 24 horas em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂ a 37 °C. Em seguida, o meio de cultura é removido e 50 µL de nanopartículas a diferentes razões N/P (0,5; 1; 2; 3 e 6) são adicionados em cada poço (repetindo a mesma razão N/P em três poços), sendo a concentração de pDNA equivalente a $3,775 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (2,5 µg/poço). Após a aplicação das nanopartículas, 100 µL de meio DMEM suplementado são adicionados às células e incuba-se a placa por 24 horas, para posterior determinação da viabilidade celular com o teste colorimétrico utilizando-se o corante MTS, como previamente descrito, e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células sem exposição às nanopartículas (controle celular) como 100%.

3.12.3 Estudos de eficiência de transfecção “*in vitro*” utilizando o plasmídeo VR1412

Os estudos de transfecção “*in vitro*” utilizando o plasmídeo VR1412 (que contém o gene da β -galactosidase (β -gal) e o promotor CMV com tamanho de 8,100 kb) foi utilizado para o preparo das nanopartículas, como os demais experimentos. Inicialmente as células HeLa em meio DMEM suplementado foram transferidas para placas de 24 poços a uma densidade de 50.000 células/poço e incubadas por 24 horas em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂ a 37 °C. Após 24 horas, o meio de cultura é removido e as células são lavadas três vezes com meio de cultura (DMEM) sem FBS e PS. Em seguida, 200 μ L de nanopartículas preparadas em tampão fosfato (pH 7,4) a diferentes razões N/P (0,5; 1; 2; 3 e 6) são adicionados em cada poço (repetindo a mesma razão N/P em três poços), sendo a concentração de pDNA equivalente a $2,265 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (1,5 μ g/poço), e após a aplicação das nanopartículas, adicionou-se 200 μ L de meio DMEM sem FBS e PS e incubou-se a placa em atmosfera de 5-95% de CO₂-O₂ a 37 °C por 2 horas. Após 2 horas as nanopartículas foram removidas dos seus respectivos poços e adiciona-se 1,0 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e a placa é novamente incubada por 24 horas. No terceiro dia, o meio é removido e adiciona-se 1,0 mL de novo meio DMEM suplementado. Após 72 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com 1,0 mL de tampão fosfato salino (PBS) gelado. A determinação quantitativa da concentração da proteína β -gal transfectada nas células utilizou o método colorimétrico a partir do kit ELISA para β -gal (ROCHE), segundo instruções do fabricante. A determinação da concentração de proteínas totais utilizou o método do ácido bicinonínico (BCA: 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) empregando o kit comercial: BCA – Thermo Scientific, e a albumina do soro bovino foi utilizada como padrão para a construção da curva analítica. Assim, pôde-se estimar a eficiência de transfecção por meio da razão entre a quantidade em pg de β -gal e a quantidade em mg de proteínas totais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t-Student.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização de fosforilcolina gliceraldeído (PC)

A obtenção dos derivados de PLL com grupos fosforilcolina depende da presença do grupo aldeído da fosforilcolina para a formação de imina (base de Schiff) com os grupos amina de PLL, seguido da redução com borocianohidreto de sódio. Deste modo, para obter estes derivados, inicialmente foi necessário preparar a fosforilcolina gliceraldeído, por meio da oxidação do s,n glicero-3-fosfocolina utilizando periodato de sódio (PICOLA, 2009).

A Figura 11 mostra o espectro de RMN de ^1H da fosforilcolina gliceraldeído com a atribuição dos hidrogênios presentes na molécula.

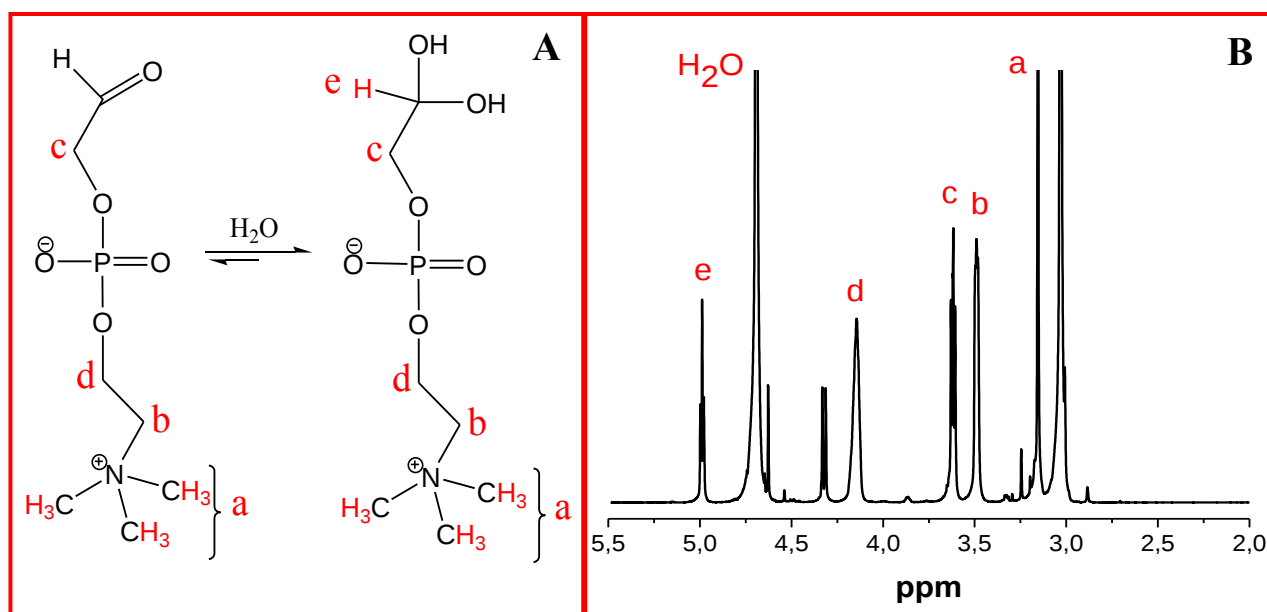


Figura 11. (A) Estrutura química da Fosforilcolina Gliceraldeído contendo as atribuições dos sinais dos hidrogênios. (B) Espectro de RMN de ^1H do PC com as respectivas atribuições, obtido em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1:100) a 25 °C com frequência de 500 MHz.

Este resultado está de acordo com o proposto por Miyazawa e Winnik (Miyazawa e Winnik, 2002). A Figura 11B confirma o equilíbrio químico proposto por Miyazawa e Winnik (2002), no qual o aldeído existe majoritariamente na forma hidratada, isto é, existe um equilíbrio ressonante, que desfavorece a formação do aldeído na presença de água,

consequentemente observa-se um sinal em aproximadamente δ 5,0 ppm. Entretanto o equilíbrio entre o aldeído e sua forma hidratada não impede a reação de substituição. O sinal em δ 3,3 ppm é atribuído aos hidrogênios das metilas do grupo trimetilamônio e foi utilizado para determinar o grau de substituição de PC nos derivados PLL-PC.

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR) também foi utilizada para confirmar o sucesso da síntese. A técnica não requer preparo prévio da amostra e foi possível registrar o espectro na região do infravermelho de PC em solução, isto é, em metanol e água (2:1), na concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 12).

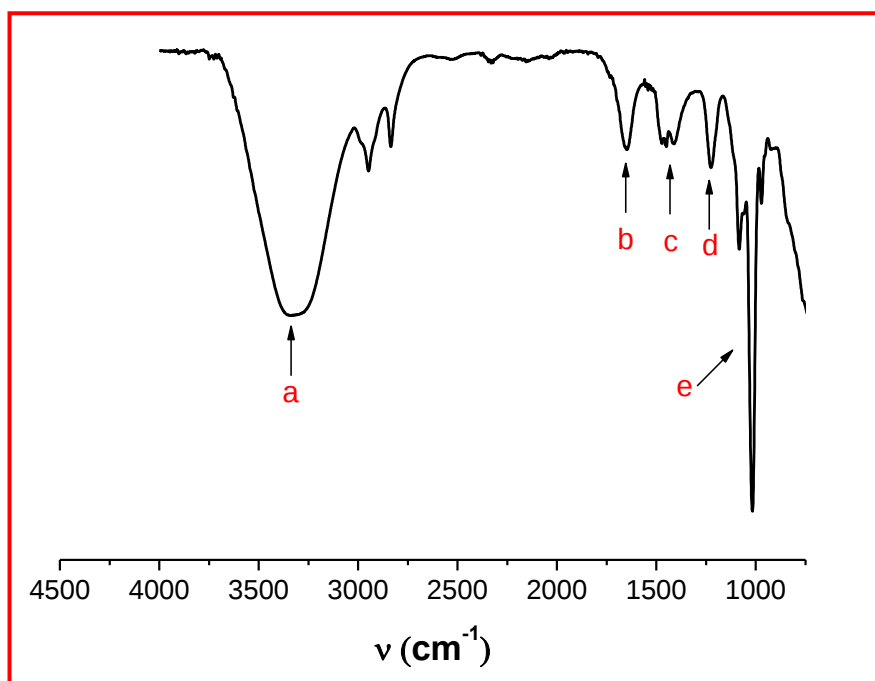


Figura 12. Espectro FTIR-ATR do composto Fosforilcolina Gliceraldeído (PC).

O espectro FTIR-ATR para o PC exibiu bandas proeminentes que comprovam o sucesso da síntese. A banda em 3325 cm^{-1} (a) corresponde à vibração da ligação O-H do solvente metanol/ H_2O , uma vez que análise foi realizada em solução; a banda na região de 1650 cm^{-1} é atribuída à ligação C=O da função aldeído (banda b); a vibração da ligação $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ provoca o aparecimento de banda em 1433 cm^{-1} (banda c); a vibração devido ao estiramento assimétrico da ligação PO_2^- provoca o surgimento de banda em 1220 cm^{-1} (banda d) e por fim a banda na frequência de 1015 cm^{-1} surge devido ao estiramento da ligação P-O-C (banda e) (TIERA *et al*, 2006; SILVERSTEIN, 1981).

Após a confirmação da síntese do grupo PC, partiu-se para a etapa de modificação da Poli(L-Lisina) com diferentes graus de substituição.

4.2 Síntese e caracterização dos derivados PLL-PC por RMN de ^1H e FTIR-ATR

Um esquema simples da síntese dos derivados zwitteriônicos de PLL-PC é mostrado na Figura 13.

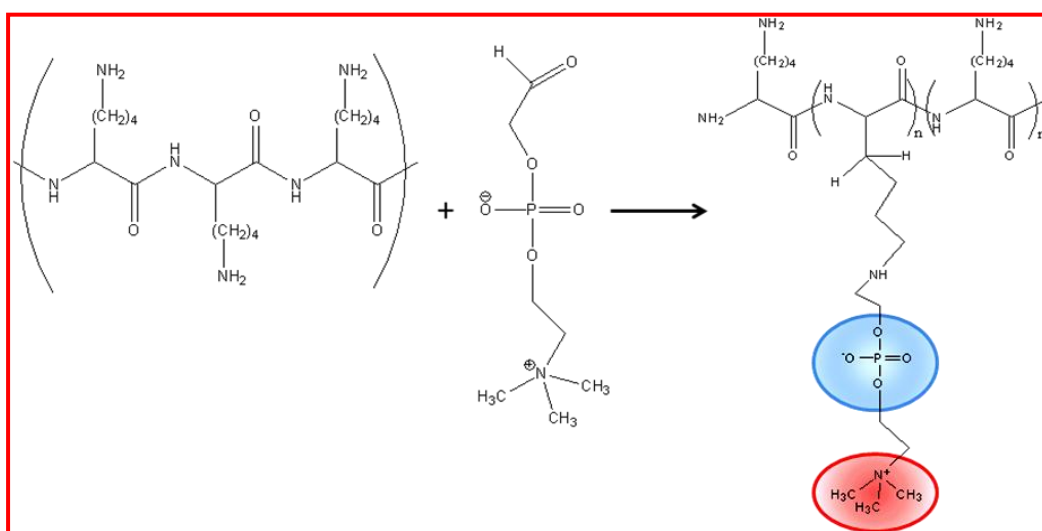


Figura 13. Representação da síntese dos derivados zwitteriônicos de PLL substituídos pelo grupo PC.

Os graus de substituição por PC foram determinados comparando-se a área do sinal referente aos hidrogênios das metilas presentes no grupo trimetilamônio de PC, com a área do sinal referente aos dois hidrogênios mais desblindados do grupo metileno, presente na cadeia lateral polimérica da PLL. Deste modo, o grau de substituição dos derivados foi determinado pela Equação 1, previamente exposta.

Na Figura 14 é apresentada a estrutura genérica dos derivados obtidos e os espectros de PC, PLL e PLL-PC, com as respectivas atribuições dos sinais dos hidrogênios utilizados na determinação dos graus de substituição. A análise dos RMNs de ^1H dos derivados comprovou a substituição pelo grupo PC, por meio do aparecimento do sinal em 3,3 ppm que caracteriza a presença de metilas do grupo trimetilamônio (pertencente ao grupo PC), sendo que o grau

de substituição foram respectivamente 7,5%, 20% e 40% de substituição para o último derivado da série.

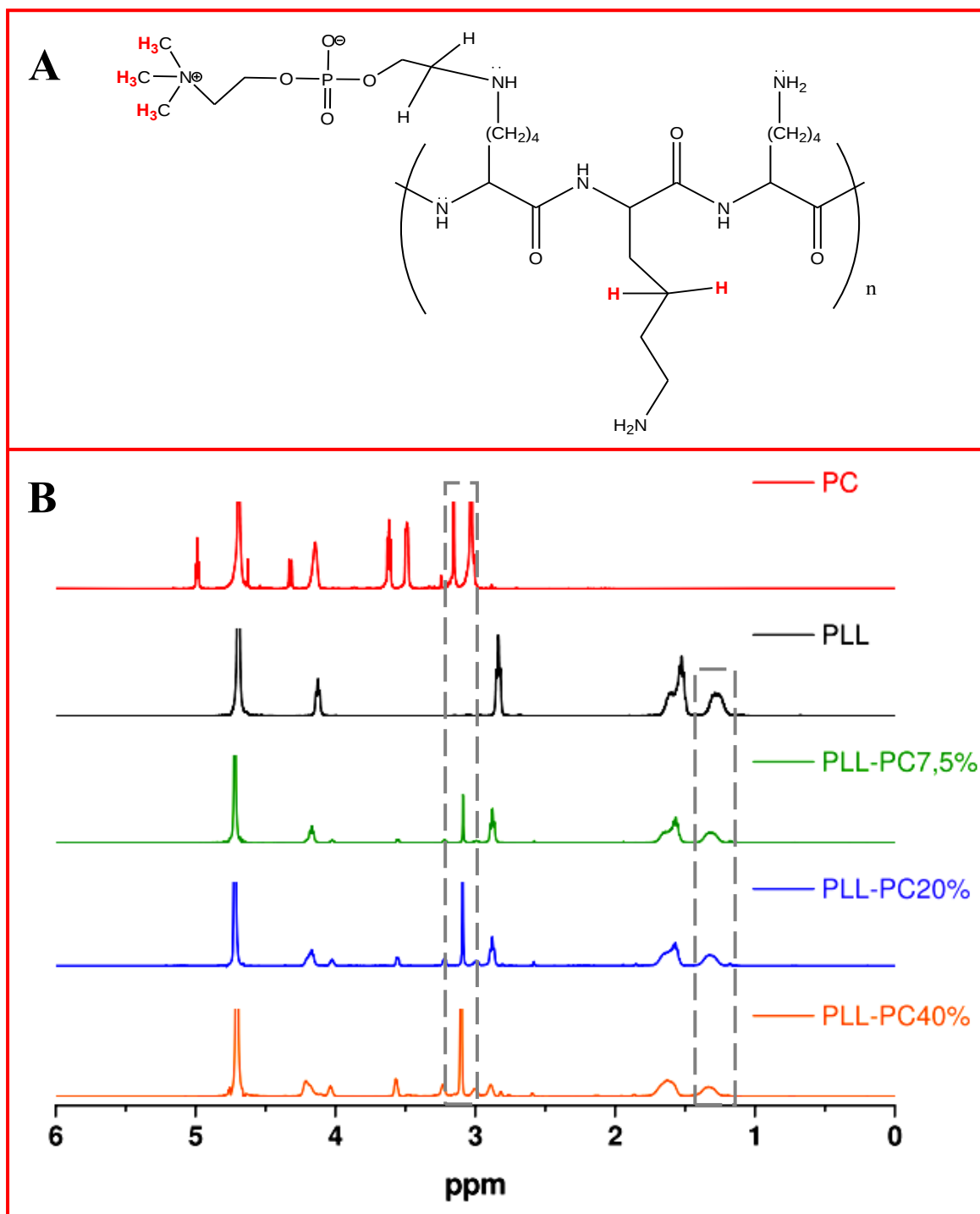


Figura 14. (A) Estrutura genérica dos derivados PLL-PC com identificação dos prótons utilizados na determinação dos graus de substituição. (B) Espectros de RMN de ^1H do grupo substituinte PC, da PLL e seus derivados modificados, PLL-PC7,5% e PLL-PC20% e PLL-PC40% obtidos em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (1:100) a 25 °C com frequência de 500 MHz.

Os espectros FTIR-ATR são mostrados na Figura 15, os quais também confirmam a inserção do grupo PC na cadeia polimérica da PLL, devido ao aparecimento de bandas características apenas nos espectros dos derivados. Estas bandas específicas na região de 1220 a 950 cm^{-1} são atribuídas ao grupo fosforilcolina, sendo que a banda em 1220 cm^{-1} aparece devido ao estiramento assimétrico do PO_2^- , a banda referente ao estiramento da ligação P=O possui frequência equivalente a 1065 cm^{-1} , e a banda cuja frequência de estiramento é 950 cm^{-1} é devida à ligação P-O-C (SILVERSTEIN, 1981; TIERA *et al.*, 2006; REISCH *et al.*, 2007).

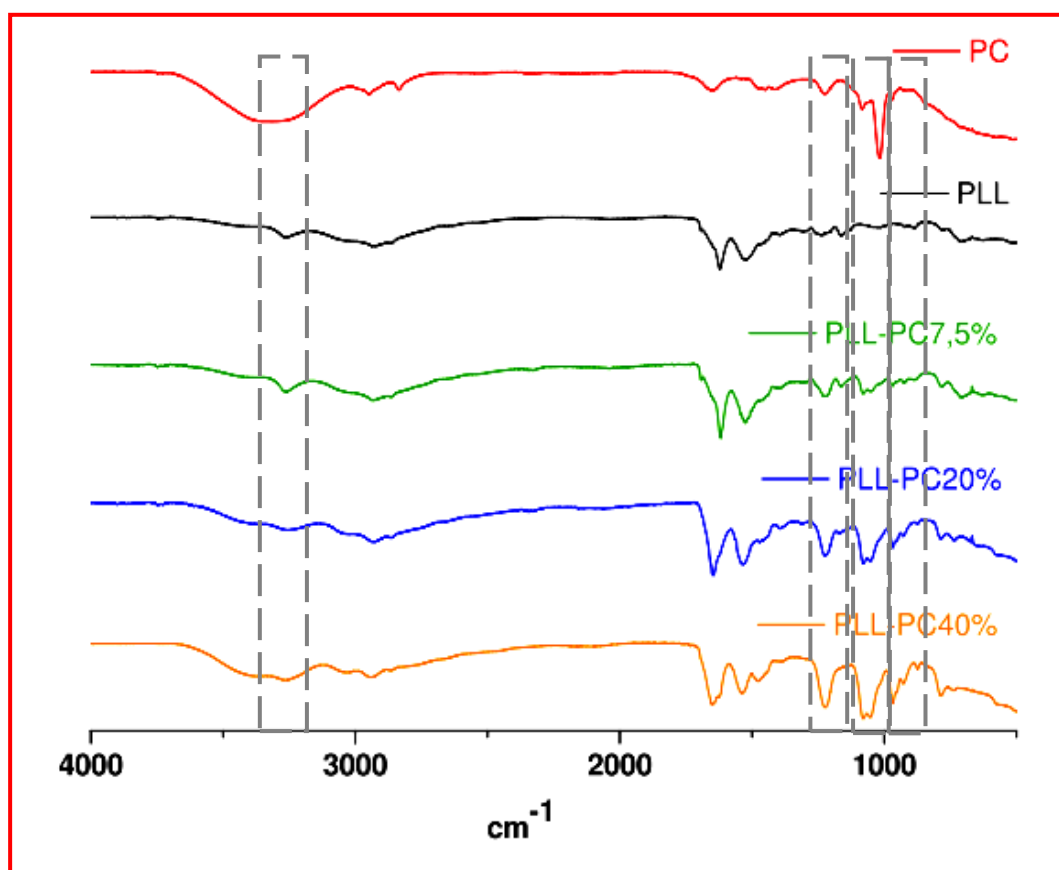


Figura 15. Espectros FTIR-ATR para a PLL e seus derivados modificados com PC com diferentes graus de substituição.

Além destas bandas que são atribuídas à presença do grupo PC nos derivados sintetizados, outras bandas se destacam. A banda na frequência de 3250 cm^{-1} é decorrente à vibração do estiramento de ligação N-H de aminas primárias alifáticas, desta forma, resalta-

se que à medida que o grau de substituição aumentou (PLL-PC40%) esta banda tornou-se menos intensa quando comparada com o polímero sem nenhuma substituição (PLL). Isto acontece, uma vez que o ataque nucleofílico e consequentemente a substituição pelo PC, ocorre neste sítio de ligação.

Outras duas bandas na região de 1650 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} são bastante intensas e surgem nos três espectros de FTIR-ATR apresentados, devido ao estiramento da ligação $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ de amidas secundárias, que estão presentes na cadeia polimérica de PLL.

4.3 Determinação do grau de substituição por potenciometria

Os graus de substituição dos derivados foram também determinados por potenciometria (Figuras 16 a 18), utilizando-se a Equação 2 que relaciona o número de mols de NaOH necessários para a total desprotonação dos grupos amina não substituídos da PLL e o número de mols de PLL que foram substituídos, desta forma permite determinar indiretamente a massa de PC e o número de mols desta unidade.

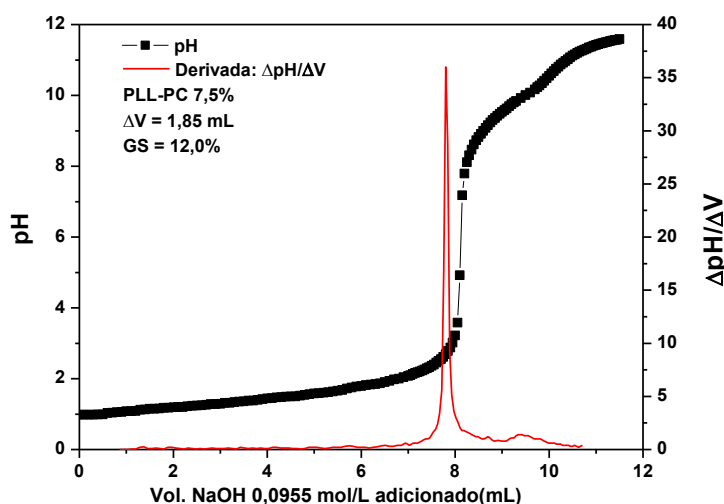


Figura 16. Titulação potenciométrica de PLL-PC7,5% para determinação do grau de substituição.

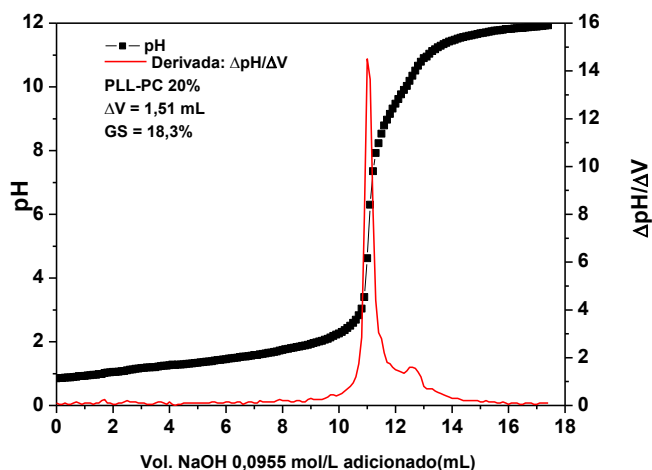


Figura 17. Titulação potenciométrica de PLL-PC20% para determinação do grau de substituição.

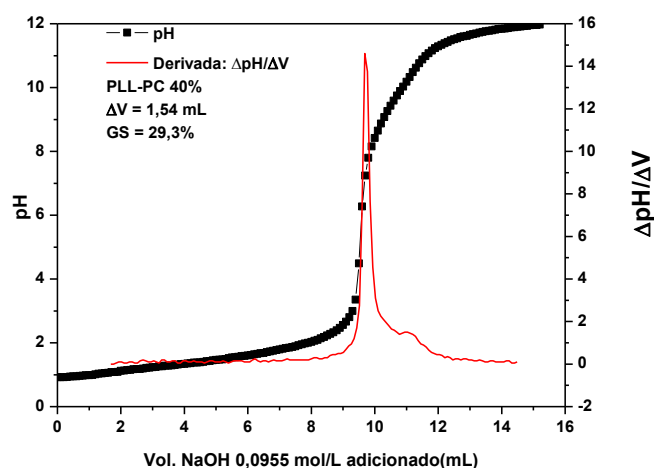


Figura 18. Titulação potenciométrica de PLL-PC40% para determinação do grau de substituição.

A Tabela 3 compara o grau de substituição obtido pelas técnicas de RMN de ^1H e potenciometria.

Tabela 3. Grau de substituição dos derivados substituídos com PC por meio das técnicas de RMN de ^1H e potenciometria.

Polímeros	Grau de Substituição (% GS)	
	RMN de ^1H	Potenciometria
PLL-PC7,5%	7,5	12
PLL-PC20%	18,3	18
PLL-PC40%	38,7	29,3

Observa-se que o grau de substituição para o derivado PLL-PC7,5% pela técnica de potenciometria foi de 12%, isto é, houve uma diferença significativa do resultado obtido por meio da técnica de RMN de ^1H . O mesmo ocorreu com o derivado PLL-PC40% sendo esta diferença ainda mais acentuada. Isto pode ter ocorrido devido à característica da PLL e seus derivados modificados serem altamente higroscópicos, acarretando em valores discrepantes. Além disso, o segundo pico no gráfico da segunda derivada não está bem definido, o que pode contribuir para aumentar o erro nos cálculos. Portanto, para todos os demais cálculos foram utilizados os valores de GS obtidos das medidas de RMN de ^1H .

4.4 Determinação da massa molar e polidispersividade por cromatografia de permeação em gel

A Poli(L-Lisina) e seus derivados foram caracterizados para determinação da massa molar, utilizando cromatografia de permeação em gel. Este método exige a utilização de padrões de massa molar monodispersos para construção de uma curva de calibração, e fornece resultados em termos de massa molar ponderal média (M_w), massa molar numérica média (M_n) e curva de distribuição de massa molar. A razão M_w/M_n é denominada índice de polidispersividade e indica o quão larga ou estreita está a curva de distribuição de massa molar do polímero. O valor de M_w é mais afetado por cadeias de alta massa molar, enquanto M_n é mais afetado pela presença de cadeias de menor massa molar. A M_w geralmente é maior que M_n , exceto para polímeros monodispersos, os quais possuem esta relação equivalente a 1,0, isto é, $M_w=M_n$. Se a diferença entre M_w e M_n for alta, a distribuição é considerada larga, ao contrário, quando a diferença entre M_w e M_n for mínima a distribuição é considerada estreita (BRETAS e D'ÁVILA, 2005).

A Figura 19 apresenta a curva de calibração utilizada para determinar a massa molar dos polímeros modificados com PC, que foi obtida por meio da injeção de padrões monodispersos Pullulan, massa molar no intervalo de 6200 à 805000 Da. O Pullulan é um polissacarídeo e pode ser definido como um glucano essencialmente linear, consistindo principalmente de unidade repetitivas de maltotrioses com algumas unidades de maltotetraoses intercaladas.

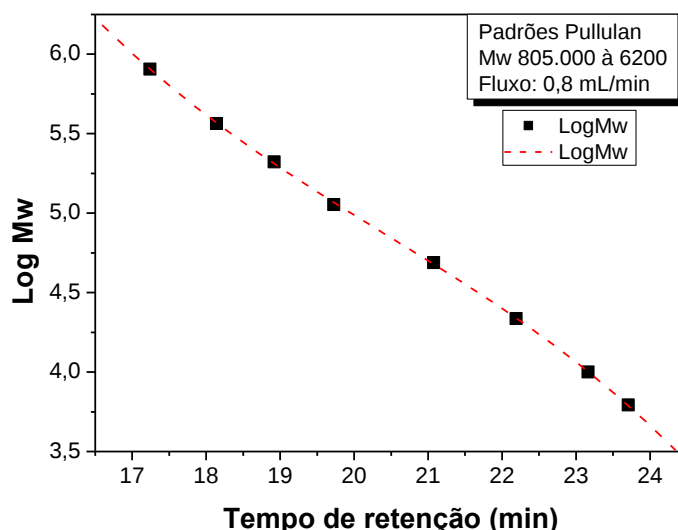


Figura 19. Curva de calibração utilizando padrões de massa molar monodispersos no intervalo de 6200 a 805000 Da.

A Tabela abaixo (Tabela 4) apresenta os valores de Mw e Mn, assim como o índice de polidispersividade obtido para a PLL e seus derivados.

Tabela 4. Valores de massa molar ponderal média (Mw), massa molar numérica média (Mn) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) para PLL e seus derivados, obtidos por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Polímeros	Mw (kDa)			Mn (kDa)			Mw/Mn	
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA	A	B
PLL	71966	71593	71779	57597	54194	55895	1,2	1,3
PLL-PC7,5%	98835	99175	99005	68317	69112	68714	1,4	1,4
PLL-PC20%	155093	143728	149410	78409	78793	78601	1,9	1,8
PLL-PC40%	115222	116034	115628	81684	80841	81262	1,4	1,4

Nota-se que com o aumento do grau de substituição há um aumento nos valores de Mw e Mn. O derivado PLL-PC20% apresentou um valor de Mw superior ao derivado com um grau de substituição maior (PLL-PC40%), o que pode estar relacionado ao preparo da amostra. O procedimento de secagem destes polímeros exige certo cuidado, uma vez que são compostos por grupamentos zwitteriônicos (PC) e estão sujeitos a ligações intercruzadas, isto é, ligações inter-cadeias devido a efeitos eletrostáticos. Verifica-se que apesar dos polímeros

não serem classificados como monodispersos ($M_w=M_n$), os índices de polidispersividade não se afastaram muito da unidade, o que também é visualizado pela a estreita curva de distribuição de massa molar dos mesmos (Figura 20).

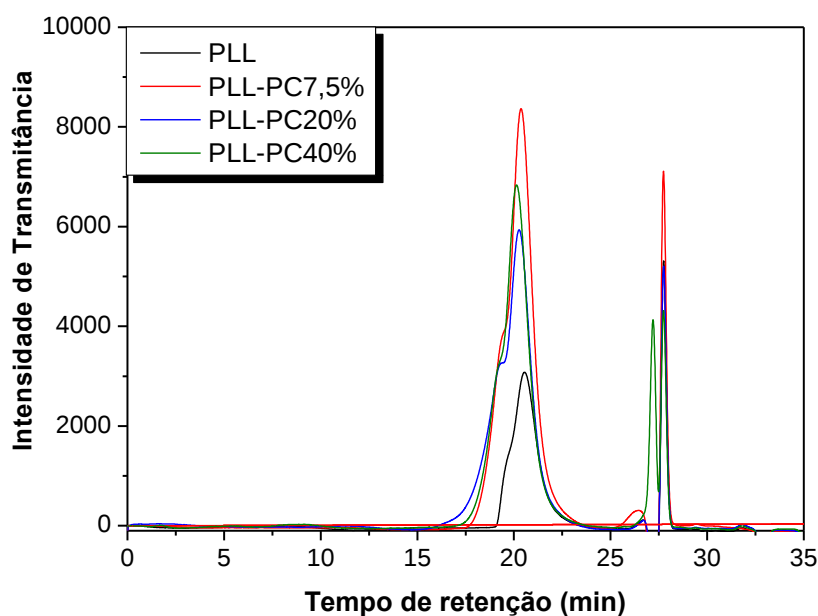


Figura 20. Curva de distribuição de massa molar da PLL e seus derivados modificados com o grupo zwitteriônico PC, obtida pela cromatografia de permeação em gel.

4.5 Determinação da capacidade de tamponamento

Uma das características que torna o vetor não viral mais eficiente para a transfecção do pDNA dentro da célula alvo é sua capacidade de tamponar o meio em que se encontra. Assim realizaram-se testes para avaliar a capacidade de tamponamento do polímero antes e após sua modificação com o grupo PC, utilizando o método de Lu *et al.* (2008). A Figura 21 apresenta o comportamento tamponante dos polímeros em solução salina 150 mmol.L⁻¹.

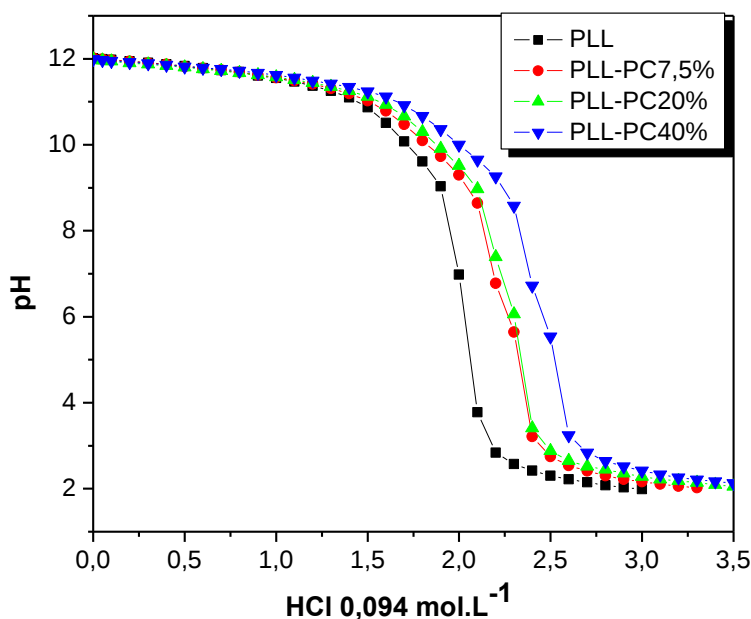


Figura 21. Capacidade de tamponamento da PLL e seus derivados em solução de NaCl 150 mmol.L⁻¹ titulado com HCl.

A análise da Figura 21 mostra que após a modificação da PLL com o grupo PC, a capacidade de tamponamento aumentou, sendo necessário maior volume de ácido para alterar o pH da solução com o aumento do grau de substituição. O resultado obtido está de acordo com estudos anteriores realizados por Oliveira *et al.* (2011) e pode melhorar a liberação do plasmídeo dentro da célula (BENNS *et al.*, 2000).

4.6 Avaliação da estabilidade e tamanho das nanopartículas em função de diferentes condições experimentais

4.6.1 Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados utilizando-se o ensaio com brometo de etídio

A capacidade da PLL e PLL-PC interagir com o DNA plasmidial foi avaliada qualitativamente por meio do ensaio com a sonda fluorescente brometo de etídio (EtBr).

Neste sentido, os resultados obtidos com a PLL e seus derivados sintetizados em solução tampão de pH 5,0 e 7,4 de maneira geral foram similares, uma vez que houve a

diminuição da intensidade de fluorescência do EtBr com a adição contínua do polímero na solução inicial. A Figura 22 apresenta o decaimento da intensidade de fluorescência da sonda EtBr em pH 5,0. A análise desta figura mostra que o decaimento da fluorescência aumenta com a razão N/P e depende da composição dos polímeros. Isto pode ser correlacionado com a força de interação, portanto quanto maior o decaimento da fluorescência, maior forte é a interação entre o polímero e o pDNA. Em pH 5,0 a intensidade de fluorescência do complexo pDNA-EtBr decai continuamente com a razão N/P atingindo um mínimo em aproximadamente 30% na razão N/P 2,0, para a PLL. Para os derivados PLL-PC7,5% e PLL-PC20% maiores razões N/P são necessárias para atingir o mínimo de fluorescência de aproximadamente 35%. Para o derivado mais substituído, PLL-PC40% este mesmo mínimo de fluorescência relativa (~35%) só é atingido quando a razão N/P é 8.

Estes resultados mostram que o aumento no grau de substituição diminui a força de interação com o pDNA, uma vez que são necessárias maiores razões N/P para produzirem o mesmo decréscimo na fluorescência. Além da proteção contra a degradação por nucleases, a liberação gênica envolve a superação de interações eletrostáticas, portanto interações mais fracas podem favorecer a liberação do pDNA.

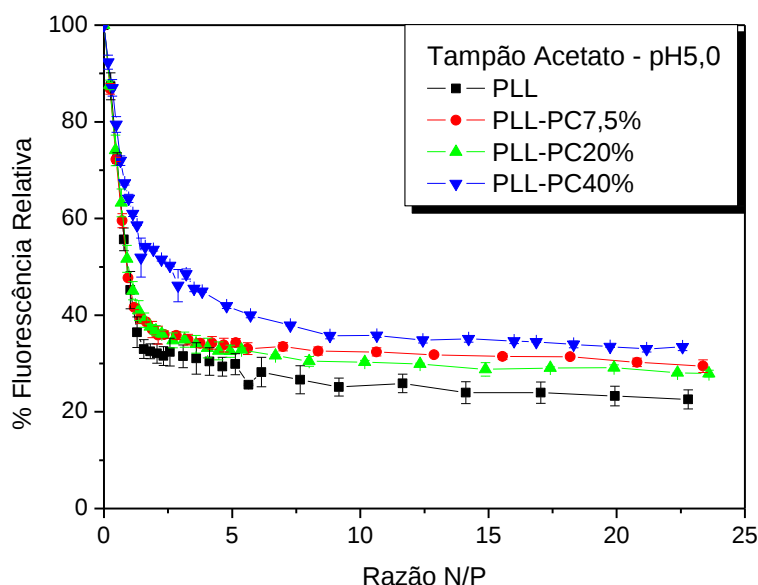


Figura 22. Titulação do complexo pDNA-EtBr por PLL e PLL substituídas com grupos PC em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L^{-1} a 25°C .

O mesmo experimento foi realizado em pH 7,4 (Figura 23) e um comportamento similar foi observado. Para os polímeros PLL, PLL-PC7,5% e PLL-PC20% a força de interação com pDNA é ligeiramente enfraquecida, uma vez que a intensidade de fluorescência atinge seu

mínimo (~25%) em razões N/P superiores ($N/P > 3,5$) comparado ao ensaio em pH 5,0. O derivado mais substituído PLL-PC40% provocou um mínimo de fluorescência de 50% na razão N/P 5, o que indica uma interação mais fraca com o plasmídeo.

Em estudos anteriores com derivados quitosana-PC verificou-se um comportamento similar, e o derivado de mesma composição proporcionou um decréscimo para 40% do valor inicial. Este efeito é resultado do decréscimo no grau de ionização em pH fisiológico, (PICOLA, 2009). Para PLL e PLL-PC o aumento do pH de 5,0 para 7,4, não afetou drasticamente a interação, o que se deve provavelmente aos maiores graus de ionização para PLL-PC no pH neutro.

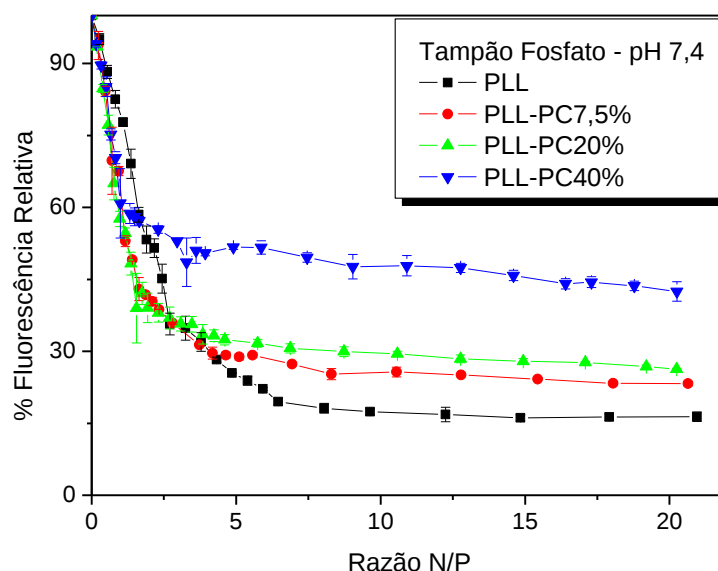


Figura 23. Titulação do complexo pDNA-EtBr por PLL e PLL substituídas com grupos PC em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L^{-1} a 25°C .

Portanto, a partir do ensaio de fluorescência verificou-se que a interação leva a formação de políplexos PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em pH 5,0 e pH 7,4. Logo pode-se inferir que a formação de nanopartículas carreadoras de pDNA ocorre devido a atrações eletrostáticas entre as cargas positivas dos polímeros estudados e as cargas negativas do pDNA, e se mostra dependente tanto do grau de substituição do polímero, quanto do pH do meio, por influenciar na densidade de cargas positivas (KWOH *et al.*, 1999; PICOLA, 2009).

4.6.2 Estudo da interação pDNA-Poli(L-Lisina) e seus derivados por meio de eletroforese em gel de agarose

A capacidade de complexação do pDNA pelos derivados foi também verificada por meio de eletroforese em gel de agarose. A estabilidade dos complexos desempenha um papel importante na proteção do pDNA contra a degradação por nucleases no meio intracelular. Neste sentido verifica-se na literatura que a eletroforese configura-se como uma ferramenta importante na avaliação da estabilidade da nanopartícula, e pode ser usada como um guia para estabelecer as condições de preparação e os estudos de transfecção.

A Figura 24 traz as imagens dos géis corados com EtBr para os complexos formados a diferentes razões N/P em força iônica de 150 mmol.L⁻¹ e pH5,0. As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese. O primeiro poço à esquerda da Figura 25A corresponde ao marcador de massa molecular - Ladder 1 kb plus.

Analizando a Figura 24A-D, observa-se que ocorre migração do pDNA apenas até a razão N/P 0,5, isto é, acima da razão 1 toda a carga negativa do pDNA é neutralizada e a intensidade de complexação é tão forte que nenhum deslocamento é verificado.

Portanto, o grau de substituição por grupos PC não afetou significativamente a força de interação entre os polications e pDNA, uma vez que todos os polímeros interagiram semelhantemente com o pDNA, liberando-o na mesma razão N/P.

O mesmo estudo foi realizado com a PLL e seus derivados em pH 7,4 (Figura 25A-D). O aumento do pH não influenciou na força de interação dos polímeros, pois a habilidade em interagir com o pDNA foi similar ao encontrado em pH 5,0. Para todas as nanopartículas investigadas, a razão N/P 1 foi suficiente para impedir a liberação do pDNA, com exceção da PLL-PC40% (Figura 25D) na qual observa-se uma leve liberação de pDNA na razão N/P 1. Ambas as constatações são coerentes com os dados de decaimento de fluorescência, uma vez que foi demonstrado que para esta série de derivados de PLL (PLL-PC7,5% e PLL-PC20%), o grau de ionização não interfere significativamente na força de interação, resultando em comportamento similar em ambos os pHs, isto é, nos dois pHs avaliados os polímeros: PLL, PLL-PC7,5% e PLL-PC20% provocaram o decaimento da fluorescência de 80%, enquanto que o derivado mais substituído com PC (PLL-PC40%) apresentou diminuição na afinidade de ligação com pDNA, decorrente da menor capacidade em deslocar a sonda EtBr para o meio aquoso, e produziu um mínimo de fluorescência de 50%.

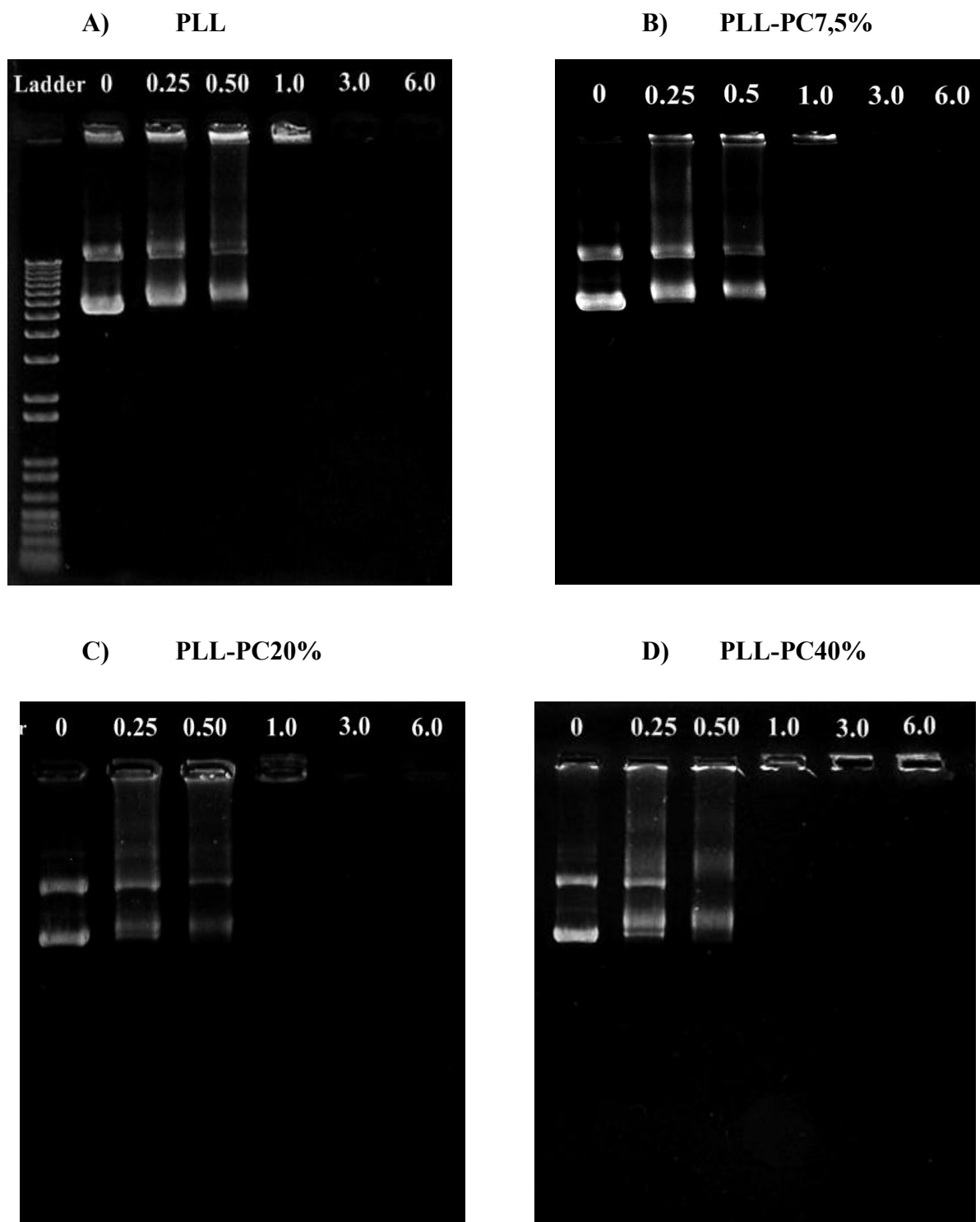


Figura 24(A-D). Eletroforese em gel de agarose dos políplexos PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹. (A) PLL; (B) PLL-PC7,5%; (C) PLL-PC20%; (D) PLL-PC40%.

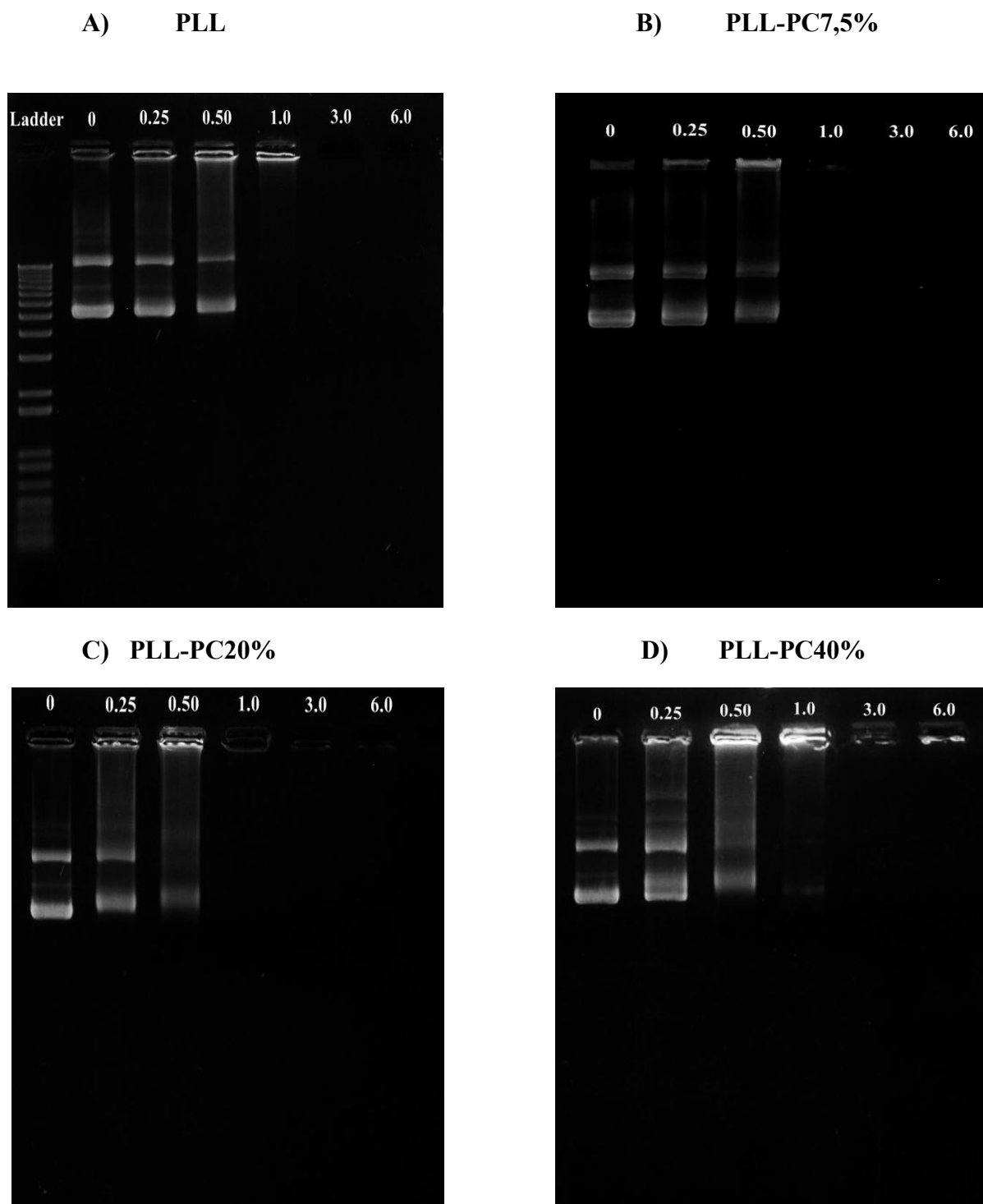


Figura 25(A-D). Eletroforese em gel de agarose dos poliplexos PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L^{-1} . (A) PLL; (B) PLL-PC7,5%; (C) PLL-PC20%; (D) PLL-PC40%.

Os resultados aqui obtidos são semelhantes àqueles reportados na literatura e confirmam que para a PLL, a razão N/P 1 é suficiente para total complexação do pDNA (CHOI *et al.*,

1998; TONCHEVA *et al.*, 1998; LEE e AHN, 2006; SUN *et al.*, 2013). Para PLL enxertada com poli(etileno)glicol os poliplexos obtidos exibem alta estabilidade, sendo o DNA plasmidial liberado somente até a razão N/P 1 (TONCHEVA *et al.*, 1998). Esta forte interação não impediu a liberação do pDNA em células Hep G2 e ainda observou-se expressão gênica após 96 horas da transfecção (CHOI *et al.*, 1998).

Sun e colaboradores (2013) verificaram que a força de interação PLL-pDNA também depende da composição de forma similar. Os autores avaliaram a força de interação de PLL e carreadores tendo como base poli(metacrilatos) substituídos com L-Lisina (PHML). Os resultados mostraram que PHML de 6kDa liberou o pDNA até a razão N/P 2, já PHML de maior massa molecular (30kDa) impediu a migração do pDNA na razão N/P 1 o que denota a dependência da força de interação com a massa molecular.

Resultados similares foram obtidos por Toncheva e colaboradores (1998), os quais relataram que PLL interage fortemente com o DNA de timo de bezerro (ctDNA), e que para razões N/P superiores a 1 o ctDNA não é liberado. Adicionalmente PLL enxertada com poli[N-2-(hidroxipropil)metacrilamida] retardou completamente a migração do ctDNA na razão N/P 1.

4.6.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e medidas de potencial zeta das nanopartículas preparadas com pDNA

O tamanho, potencial zeta e a morfologia das nanopartículas são parâmetros que influenciam na citotoxicidade, captação celular, liberação dos genes e transfecção em células (SUN *et al.*, 2013). As medidas dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas foram obtidas por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Os ensaios de fluorescência com EtBr e os experimentos de eletroforese mostraram que os derivados de PLL são capazes de formar poliplexos em baixas razões N/P. Entretanto como a força de interação é dependente desta razão, a análise por DLS teve como objetivo verificar o efeito da razão N/P e do pH sobre o tamanho das nanopartículas hidratadas bem como sua carga superficial e estabilidade.

Em geral, em pH 5,0 os poliplexos diminuem de tamanho com o aumento da razão N/P, uma vez que a densidade de carga positiva no complexo é aumentada. Uma variação brusca no diâmetro hidrodinâmico das partículas pode ser notado na razão N/P 1 (Figura 26). Este

comportamento pode ser atribuído à neutralização das cargas negativas do pDNA com as cargas positivas do polícatión resultando na minimização da repulsão eletrostática e consequentemente agregação das partículas em solução. Resultados similares vêm sendo reportados na literatura (KWOH *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2013). Kwoh e colaboradores (1999) visualizaram este mesmo efeito em estudo com PLL de massa molares distintas, e acrescentaram que quanto maior a massa molar da PLL, maior a tendência à agregação, resultando em políplexos com tamanhos elevados.

A Figura 26 permite inferir que quanto maior o grau de substituição por PC, menor é o efeito da agregação e com o aumento da razão N/P, as nanopartículas complexadas com pDNA tendem a diminuir seus diâmetros hidrodinâmicos, sendo estes aproximadamente 300 nm em baixas razões N/P e 150 nm em razões mais elevadas.

Estudos realizados com polietilenoimina modificadas com proporções crescentes do grupo 12-acriloiloxi dodecil fosforilcolina (PEI-ADPC) mostraram que o aumento do grau de substituição por PC também provoca uma maior compactação do pDNA dentro das nanopartículas, tornando-as menores. Também relataram a dependência do tamanho em relação ao aumento na razão N/P, sendo que, com o aumento da razão N/P partículas menores são obtidas (CHEN *et al.*, 2013).

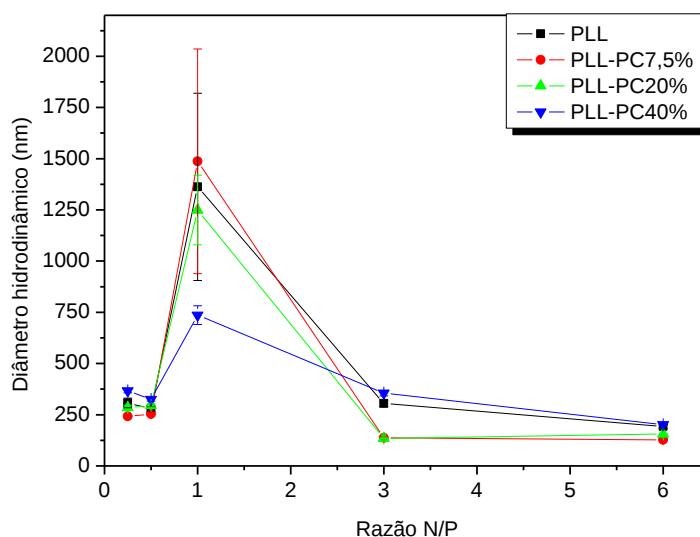


Figura 26. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em função da razão N/P em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica 150 de mmol.L⁻¹

As medidas de potencial zeta são apresentadas na Figura 27, e inicialmente observa-se que as nanopartículas exibem carga superficial negativa, uma vez que a razão de cargas

referente ao pDNA é superior a do polication. O aumento da razão N/P causa uma elevação brusca no potencial zeta, sendo que inicialmente os potenciais são negativos (~ -25 mV), atingem valores próximos à neutralidade para a razão N/P 1 e por fim atingem potenciais positivos acima da razão N/P 1 ($\sim +25$ mV) (Figura 28). Outros derivados de PLL estudados na literatura levaram a formação de nanopartículas com potenciais zeta similares e para razões N/P acima de 2 patamares em $+20$ mV são atingidos (MIDOUX e MONSIGNY, 1999; LEE e AHN, 2006)

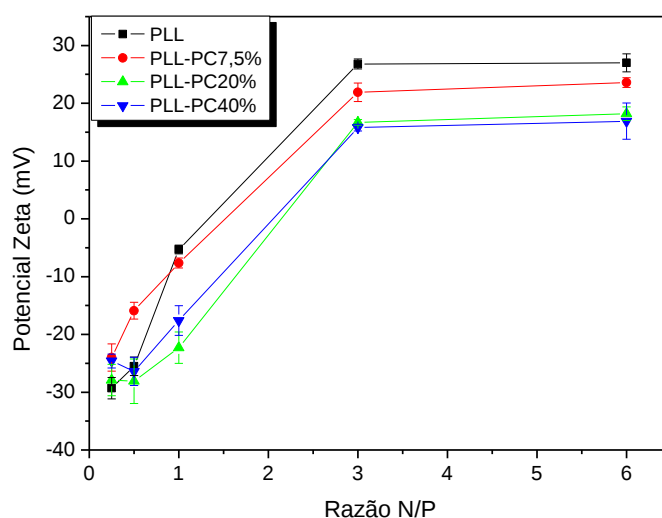


Figura 27. Potencial zeta das nanopartículas em função da razão N/P em tampão acetato, pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L^{-1} .

É importante ressaltar que a carga superficial positiva das nanopartículas, é uma importante condição no processo de internalização do políplexo por endocitose, uma vez que este é dependente da interação eletrostática entre os políplexos e a membrana celular (LEE e AHN, 2006). Em pH 7,4, verifica-se um aumento pronunciado dos diâmetros hidrodinâmicos, sobretudo para PLL, que comparada aos derivados substituídos formou partículas da ordem de micrometros, denotando que a substituição com grupos PC aumenta a estabilidade coloidal das partículas (Figura 28). O potencial zeta das nanopartículas também foi afetado pela variação no pH, sendo obtido um patamar de aproximadamente $+10$ mV acima da razão N/P 1 (Figura 29). Nota-se também que a substituição por grupos PC aumenta o potencial zeta das nanopartículas, o que indica que a substituição com PC aumenta o pKa dos grupos amino, afetando o grau de ionização dos derivados em pH 7,4.

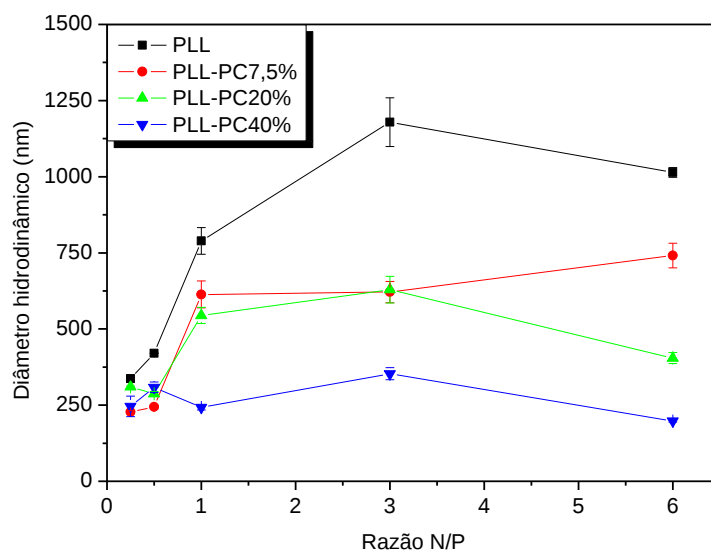


Figura 28. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA em função da razão N/P em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹.

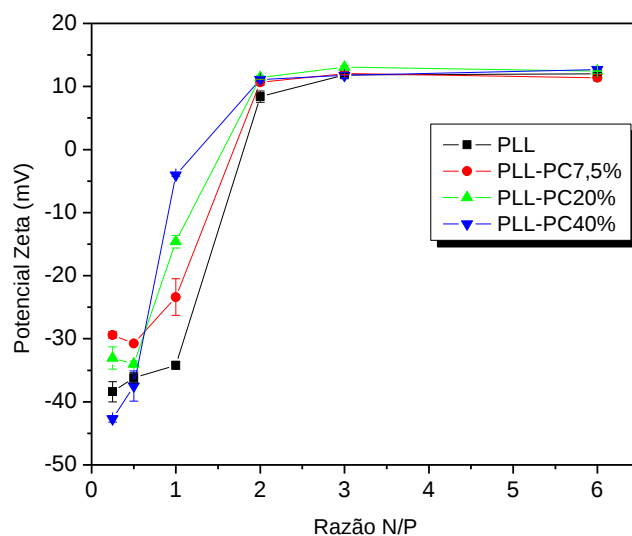


Figura 29. Potencial zeta das nanopartículas em função da razão N/P em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹.

Estudos tem mostrado a influência da força iônica no tamanho e estabilidade das nanopartículas. Em geral, a presença de sal (NaCl) em solução pode provocar o aumento da nanopartícula formada e sua instabilidade com o tempo (KWOH *et al.*, 1999; WARD *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2013). Sendo assim, testes cinéticos foram realizados preparando as nanopartículas em pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹ na razão N/P 3,0, a fim de se avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas em solução. Pode-se observar que

PLL e PLL-PC7,5% aumentam seus diâmetros hidrodinâmicos em função do tempo, já os derivados mais substituídos mantiveram-se estáveis em todo o intervalo de tempo analisado (Figura 30), comprovando que a substituição por fosforilcolina pode melhorar as características do polímero de partida, PLL.

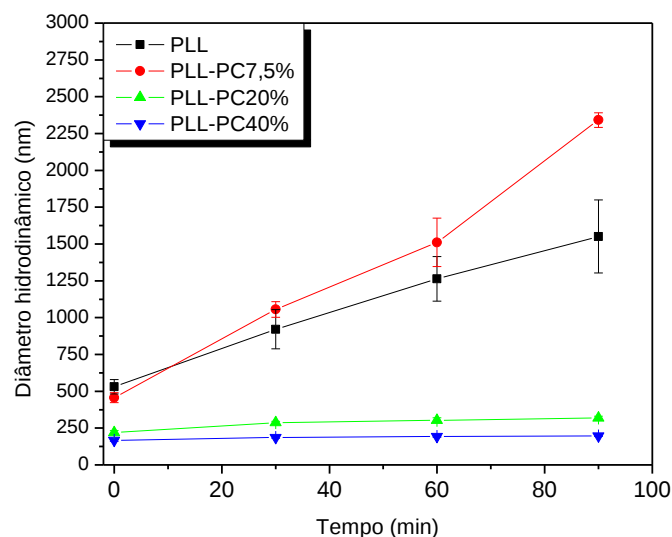


Figura 30. Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA na razão N/P 3,0, tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹ em função do tempo (minutos).

Após a caracterização físico-química das nanopartículas, experimentos de citotoxicidade e transfecção “*in vitro*” foram realizados para avaliar o potencial biológico dos vetores propostos, quanto à aplicação em transfecção gênica.

4.7 Estudos de citotoxicidade e transfecção “*in vitro*”

4.7.1 Estudos de citotoxicidade dos polímeros

A biocompatibilidade é uma das principais características de biomateriais. Segundo a norma ISO 10993 – parte 5, testes de citotoxicidade são pré-requisitos importantes para a avaliação de qualquer material que se pretenda aplicar clinicamente (ISO 10993-5).

A citotoxicidade “*in vitro*” de polímeros sintéticos geralmente é avaliada utilizando testes que verificam a atividade metabólica celular ou a integridade da membrana das células (KADLECOVA *et al.*, 2012). Entre os testes que verificam a integridade da membrana celular estão, o teste de liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) após a ruptura da membrana celular e o teste de hemólise.

Métodos colorimétricos podem ser utilizados para a avaliação quantitativa da viabilidade celular via atividades metabólicas, aplicando-se corantes como o MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e a combinação de MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio/PMS (reagente acoplador de elétrons), que podem ser bio reduzidos pela enzima desidrogenase mitocondrial presentes nas células viáveis, formando-se cristais de formazana que podem ser detectados colorimetricamente. A diferença entre o uso destes dois corantes, é que o MTT forma cristais de formazana insolúveis em meio aquoso, sendo necessário o uso de solventes orgânicos para a realização do teste, enquanto os cristais de MTS são solúveis.

A conversão de MTS para o cristal de formazana, devido a atividades metabólicas das células é mostrada abaixo (Figura 31).

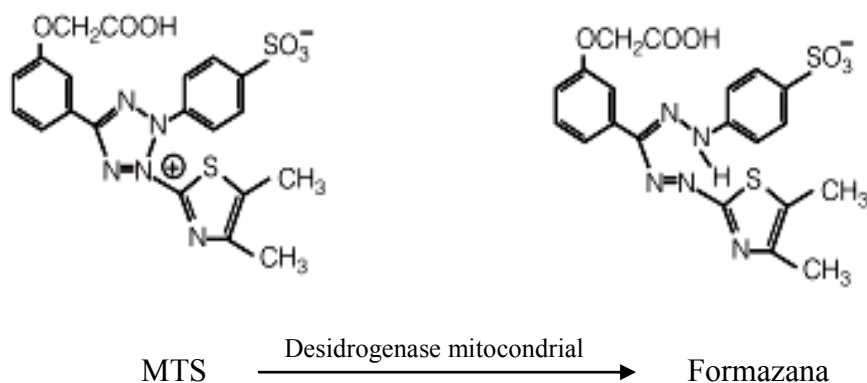


Figura 31. Estrutura do sal de tetrazólio MTS e seu produto formazana.

Neste sentido, a viabilidade celular em células HeLa foi avaliada por meio do método colorimétrico, utilizando o corante MTS. O ensaio foi conduzido variando-se a concentração dos derivados sintetizados. A Figura 32 apresenta o gráfico de viabilidade celular e pode-se verificar um aumento na citotoxicidade do polímero com o aumento da concentração dos mesmos, e avaliando-se cada derivado modificado, a PLL-PC40% foi a que apresentou menor efeito citotóxico na proliferação celular, mesmo quando comparado ao vetor comercial

LipofectaminaTM2000. Pode-se também inferir que, até a concentração de 10 µg/mL todos os derivados permitiram viabilidade celular superior a 80%, concentração suficiente para o preparo de nanopartículas a elevadas razões N/P, o que permite o estudo destes polímeros como vetores para a transferência gênica, além disso, segundo a norma ISO 10993 – parte 5, se a viabilidade celular é superior a 70%, o biomaterial pode ser considerado sem potencial tóxico (ISO 10993-5).

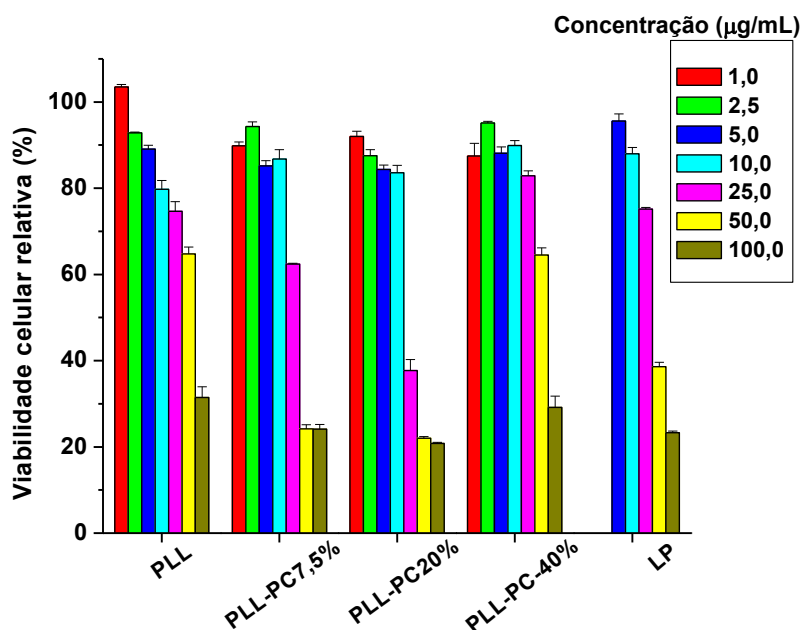


Figura 32. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função da concentração de PLL e PLL substituídas com grupos PC.

A partir deste teste foi possível determinar graficamente a concentração na qual ocorre 50% de inibição da viabilidade celular (CI_{50}), os dados são apresentados na tabela a seguir (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para PLL, derivados substituídos com fosforilcolina e o lipídeo catiônico comercial LipofectaminaTM2000.

Polímeros	PLL	PLL-PC7,5%	PLL-PC20%	PLL-PC40%	Lipofectamina
CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	63,2	31,5	21,6	70,4	45,2

*valores calculados com n=3, obtido por meio da ferramenta bio-estatística GraphPad Prism

Os valores de CI_{50} para os derivados com graus de substituição 7,5% e 20% apresentaram CI_{50} inferior ao do polímero de partida PLL, sendo o derivado PLL-PC 20% o que provocou o maior efeito citotóxico. Isto pode estar relacionado a Mw deste derivado, pois é conhecido que o aumento da Mw pode provocar um aumento da citotoxicidade do polímero (HILL *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2005; SYMONDS *et al.*, 2005; KADLECOVA *et al.*, 2012).

Vários autores reportaram o efeito da Mw sobre a citotoxicidade de várias linhagens celulares. Hill *et al.* (1999), verificou que PLL de 22 kDa exibiu efeitos citotóxicos inferiores quando comparada com PLL de 243 kDa sobre as células HepG2 e HL60. Chen *et al.* (2005) analisou três séries de PLLs, de 52,7 kDa, 34,3 kDa e 9,4 kDa sobre células embrionárias de ratos (NIH/3T3) e verificou que a CI_{50} foi respectivamente, 5,5; 8,3 e 16,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além do efeito de Mw sobre a citotoxicidade, variações estruturais influenciam na viabilidade celular, sendo que PLL com estruturas dendríticas e hiperamificadas são mais tóxicas que a análoga linear. Este resultado tem sido explicado correlacionando-se com a degradação enzimática de PLL, que no caso da PLL linear é completa, em contraste com a degradação parcial que ocorre nas duas primeiras (KADLECOVA *et al.*, 2012). Arnold e colaboradores (1979) ainda verificaram que a Poli(L-Lisina) provoca uma inibição em células HeLa maior em um menor intervalo de tempo quando comparado com o isômero Poli(D-Lisina).

Em geral, pode-se inferir que existe uma série de fatores que devem ser considerados para diminuir o efeito citotóxico de polímeros, tais como a massa molecular, a geração (no caso de polications baseados em dendrímeros), densidade de carga positiva, uma vez que maiores interações eletrostáticas com a superfície da membrana celular pode resultar em disrupção da mesma, e portanto maior citotoxicidade, além de otimizar a concentração dos polications (KADLECOVA *et al.*, 2012).

4.7.2 Estudos de citotoxicidade das nanopartículas

A citotoxicidade das nanopartículas preparadas com PLL e seus derivados foi avaliada por meio do teste de proliferação celular com células HeLa, utilizando o corante MTS para a detecção da viabilidade celular relativa. A exposição das células HeLa às nanopartículas preparadas em diferentes razões N/P foi realizada em tampão acetato pH 5,0 e força iônica 150 mmol.L^{-1} e permitiram obter um perfil da citotoxicidade como exposto na Figura 33.

A formação das nanopartículas diminui a densidade de cargas positivas dos polímeros, portanto verifica-se que as viabilidades celulares são maiores do que quando comparado às obtidas quando se trata apenas dos polímeros.

Nestas condições de pH e força iônica, pode-se notar que as viabilidades celulares atingem valores ao redor de 70% para todos os derivados. Para razão N/P 1, ou seja, quando a nanopartícula apresenta o potencial zeta próximo a neutralidade, a viabilidade celular atinge um máximo ao redor de 85%. Da mesma forma, o aumento da razão N/P provoca o aumento da citotoxicidade da nanopartícula, resultado do aumento da densidade de carga positiva.

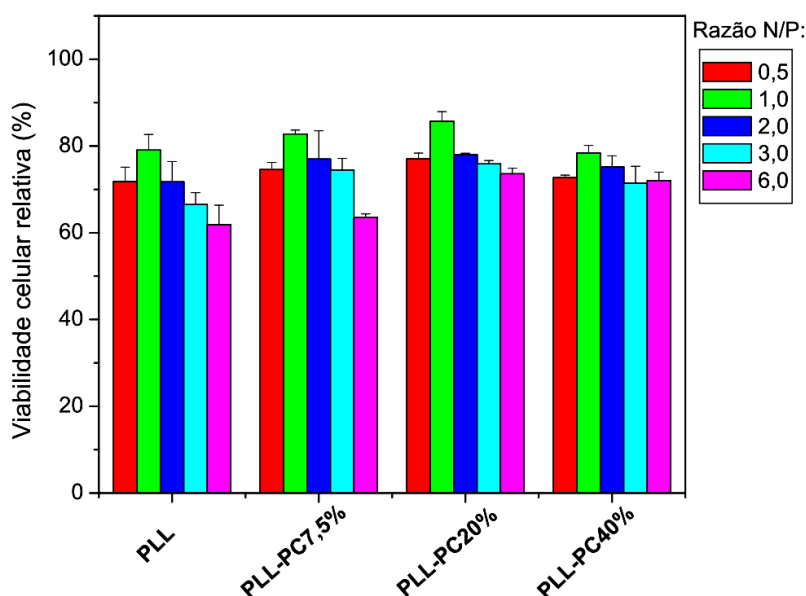


Figura 33. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função de diferentes razões N/P para as nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA substituídas, preparadas em pH 5,0 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹.

Em pH 7,4 a viabilidade celular relativa (Figura 34) se mostrou superior quando comparado com o mesmo experimento em pH 5,0, uma vez que no pH 7,4 a densidade de carga superficial positiva é menor (resultados já apresentados). Em geral a viabilidade celular é superior a 80% para todos os derivados modificados e com o aumento do grau de substituição, pode-se verificar um ligeiro aumento na viabilidade celular. Novamente, com o aumento da razão N/P, ocorre a diminuição da viabilidade celular. Este resultado é um bom indicativo da biocompatibilidade dos políplexos uma vez que a viabilidade celular apresentou níveis aceitáveis (> 70% de viabilidade celular) (ISO 10993-5).

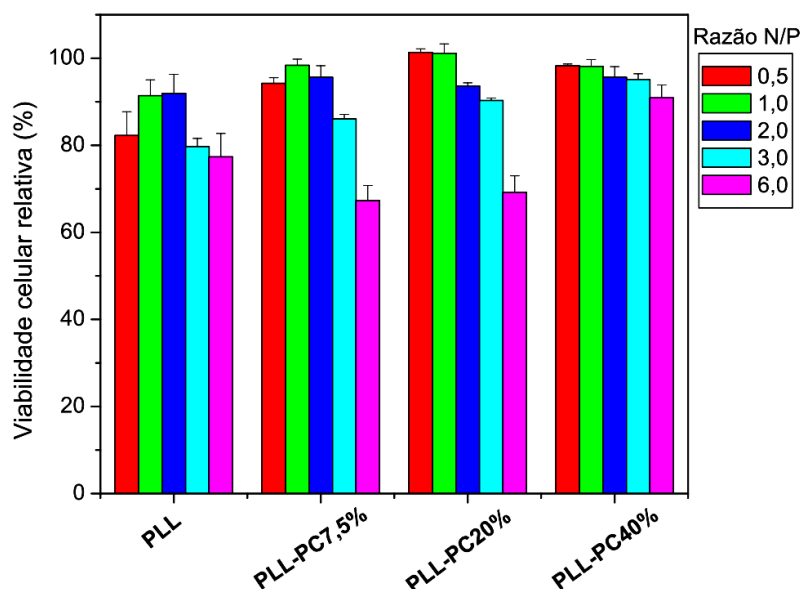


Figura 34. Viabilidade celular relativa de células HeLa em função de diferentes razões N/P para as nanopartículas de PLL/pDNA e PLL-PC/pDNA substituídas, preparadas em pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹.

Entre os mecanismos envolvidos na morte celular, destacam-se necrose, apoptose e autofagia (LIN *et al.*, 2012). A necrose é definida como a morte celular imediata, causada pelo colapso interno e inchaço de organelas citoplasmáticas. A apoptose ou morte celular programada é a via mais comumente sugerida após 12 horas de exposição ao polícatión ou políplexo, e está relacionada com liberação do citocromo C da mitocôndria, com consequente ativação da caspase-3 (KADLECOVA *et al.*, 2012). Já a autofagia consiste em um processo de degradação lisossomal intracelular e pode desempenhar importante papel na sobrevivência celular, quando estas são submetidas a determinadas condições de estresse (CHEN *et al.*, 2010). Estudos tem demonstrado que PLL lineares provocam morte celular via apoptose (SYMONDS *et al.*, 2005) e que a autofagia induzida auxilia no processo de sobrevivência de células HeLa tratadas com PLL (LIN *et al.*, 2012).

4.7.3 Estudos de transfecção “*in vitro*” utilizando o plasmídeo VR1412

A eficiência de transfecção “*in vitro*” em células HeLa foi avaliada em pH 7,4 e força iônica 150 mmol.L⁻¹ utilizando-se o DNA plasmidial VR1412, que contem o gene da β -

galactosidase. Para isso foi utilizado o ensaio ELISA para detecção da expressão da proteína β -gal e o ensaio de BCA para a quantificação de proteínas totais. As nanopartículas preparadas foram comparadas com o lipídeo comercial Lipofectamine™2000.

A Figura 35 apresenta os resultados de eficiência de transfecção, na qual pode-se verificar que a eficiência depende diretamente da razão N/P. Para razão N/P menor que 1,0 (N/P 0,5) todos os derivados mostraram-se pouco eficientes quanto a transfecção do pDNA, resultado da baixa carga superficial positiva exibida e consequentemente dificuldade do vetor atravessar a membrana celular. À medida que a razão N/P aumenta, verifica-se o aumento da eficiência de transfecção, sendo que este atinge um máximo e volta a diminuir para razões N/P maiores. Este resultado pode ser atribuído a um aumento do potencial zeta das nanopartículas e com isto, favoreceu-se a interação com a membrana celular e a consequente liberação e expressão da β -gal (razões N/P 1,0; 2,0 e 3,0). Entretanto, para maiores razões N/P (razão 6,0), o excesso de policação diminui a viabilidade celular como demonstrado na Figura 34 (acima). Essa condição pode diminuir a eficiência de transfecção, uma vez que além do decréscimo na viabilidade celular, a presença do excesso de policação associado à partícula pode prejudicar a liberação do plasmídeo. Este excesso do policação (razões N/P muito elevadas) resultou na diminuição da expressão da proteína β -gal (PLL) ou provocou a morte celular, impedindo a quantificação da expressão da proteína (derivados modificados).

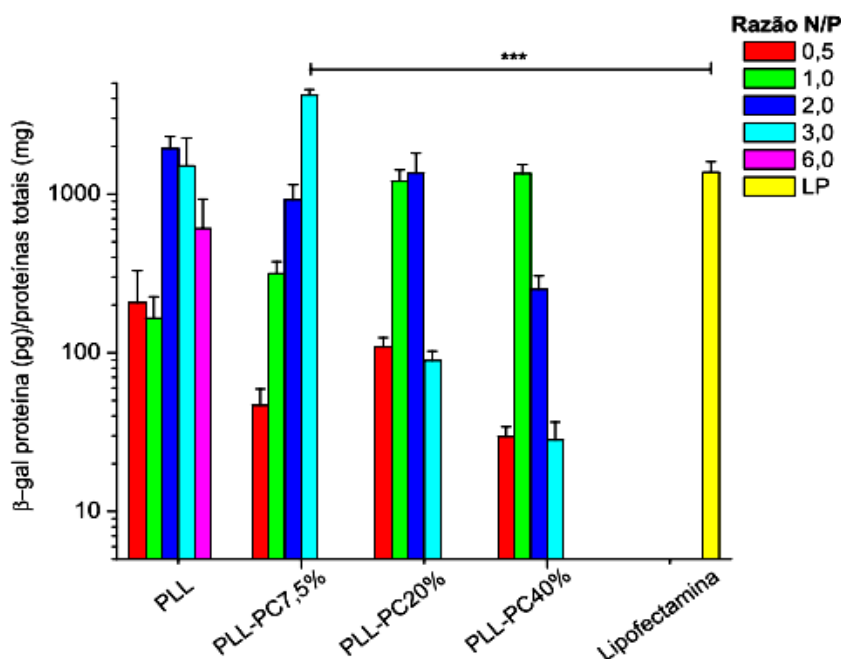


Figura 35. Eficiência de transfecção “*in vitro*” em células HeLa para as nanopartículas formadas pela PLL e seus derivados com o DNA plasmidial VR1412, avaliada em pH 7,4 e força iônica de 150 mmol.L⁻¹. Valores de expressão da β -gal (pg)/ proteínas totais (mg) em função da razão N/P, (n=3; *** p < 0,0001).

Resultados recentes mostraram que nanopartículas preparadas com PLL atingem diâmetros da ordem de 130 nm quando em tampão HEPES 1,0 mmol.L⁻¹, e que aumentam para ordem de micrômetros em força iônica 150 mmol.L⁻¹ de NaCl. Nesse estudo, as partículas exibiram eficiências de transfecção que variaram de 20 a 40% dependendo do tipo de DNA utilizado (DHANOYA, *et al.* 2011). A literatura reporta ainda que PLL pode alcançar eficiências de transfecção comparáveis a LipofectaminaTM2000 (OHAMA *et al.*, 2005) Portanto os resultados aqui apresentados para PLL são similares a literatura, e os derivados apresentaram como vantagem adicional o aumento da eficiência de transfecção (PLL-PC-7,5%) com partículas com estabilidade coloidais superiores (PLL-PC-7,5%, PLL-PC-20% e PLL-PC-40%).

5 CONCLUSÕES

A reação de síntese do grupo fosforilcolina gliceraldeído, assim como as de modificação da PLL se mostraram eficazes, confirmadas pelas técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e FTIR-ATR. A análise por RMN de ^1H permitiu a caracterização dos derivados e mostrou que o grau de substituição pode ser aumentado de forma gradativa, pelo controle da composição da mistura reacional. O grau de substituição influenciou positivamente a capacidade de tamponamento, comprovando um aumento na capacidade tamponante com o aumento do grau de substituição, propriedade que melhora a eficiência de transfecção. A partir dos resultados obtidos com o ensaio do EtBr e eletroforese em gel de agarose, confirmou-se a capacidade de PLL e seus derivados para formar poliplexos com o DNA (PLL-pDNA e PLL-PC-pDNA). Em geral, esta interação mostra-se dependente do grau de substituição do polímero, ligeiramente dependente do pH do meio, por influenciar no estado de protonação do polímero e da razão N/P. Os estudos realizados permitiram visualizar a capacidade dos vetores propostos em proteger e estabilizar o pDNA. Ensaio de espalhamento de luz dinâmico mostraram que o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas pode variar de 150 a 300 nm em pH 5,0 e 350 a 750 nm em pH 7,4, sendo que os mesmos foram bastante dependentes da razão N/P e da composição dos derivados. As nanopartículas agregam na razão N/P 1, em virtude da minimização da repulsão eletrostática. O teste cinético em pH 7,4 na razão N/P 3,0 para todos os polímeros permitiu demonstrar que as nanopartículas apresentam estabilidade coloidal, sem perder a capacidade de transfecção, sendo que as mais substituídas mostraram-se mais estáveis. A maior estabilidade coloidal pode ser atribuída aos grupos fosforilcolina cuja hidratação impede a agregação das nanopartículas. O ensaio de proliferação celular mostrou que a substituição por PC pode reduzir a toxicidade das nanopartículas formadas nos dois pHs avaliados. A eficiência de transfecção em pH 7,4 determinada pela detecção da expressão da proteína β -gal permite inferir que todos os polímeros apresentaram ao menos uma razão N/P ideal na qual a eficiência de transfecção é comparável ao vetor lipídico comercial LipofectaminaTM2000, sendo as nanopartículas preparadas com PLL-PC7,5% na razão N/P 3,0, PLL-PC20% na razão N/P 2,0 e PLL-PC40% na razão N/P 1,0 as que atendem às características desejáveis aos vetores não-virais com elevada transfecção gênica, podendo ser possíveis candidatos à terapia gênica. Portanto, a substituição com fosforilcolina permitiu preparar nanopartículas carregadas positivamente em pH 7,4 com estabilidade coloidal e

baixa citotoxicidade “*in vitro*” e ainda pôde-se estabelecer as condições ideais para o uso das mesmas como possíveis vetores não-virais aplicáveis à transferência gênica.

REFERÊNCIAS

Ahmed, M.; Jawanda, M.; Ishihara, K.; Narain, R. Impact of the nature, size and chain topologies of carbohydrate-phosphorylcholine polymeric gene delivery systems. **Biomaterials** 2012; 33: 7858–7870.

Arnold Jr., L.J.; Dagan, A.; Gutheil, J.; Kaplan, N.O. Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1979; 76: 3246–3250.

Barati, S.; Hurtado, P.R.; Zhang, S.H.; Tinsley, R.; Ferguson, I.A.; Rush, R.A. GDNF gene delivery via the p75(NTR) receptor rescues injured motor neurons. **Exp. Neurol.** 2006; 202: 179–188.

Benms, J.M.; Choi, J.S.; Mahato, R.I.; Park, J.S.; Kim, S.W. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. **Bioconjugate Chem.** 2000; 11: 637–645.

Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1995; 92(16): 7297–7301.

Bretas, R.E.S.; D'avila, M.A.; Reologia de Polímeros Fundidos. São Carlos: Editora UFSCAR, 2005.

Cai, J.; Yue, Y.; Rui, D.; Zhang, Y.; Liu, S.; Wu, C.; Effect of Chain Length on Cytotoxicity and Endocytosis of Cationic Polymers. **Macromolecules** 2011; 44: 2050–2057.

Casé, A.H.; Dalla Picola, I.P.; Zaniquelli, M.E.; Fernandes, J.C.; Taboga, S.R.; Winnik, F.M.; Tiera, M.J. Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans. **J. Colloid Interface Sci.** 2009; 336(1): 125–133.

Chan, C.K.; Senden, T.; Jans, D.A. Supramolecular structure and nuclear targeting efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines. **Gene Ther.** 2000; 7: 1690–1697.

Chen, Y.; Azad, M.B.; Gibson, S.B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 2010; 88: 285–295.

Chen, Y.; Wang, G.; Kong, D.; Zhang, Z.; Yang, K.; Ranlu, L.; Zhao, W. Xu, Y. In vitro and in vivo double-enhanced suicide gene therapy mediated by generation 5 polyamidoamine dendrimers for PC-3 cell line. **World Journal of Surgical Oncology** 2012; 10:3.

Chen, L.; Wang, W.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Hu, Q.; Ji, J. Bioinspired phosphorylcholine-modified poliplex as an effective strategy for selective uptake and transfection of cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 2013; 111: 297–305.

Choi, Y.H.; Liu, F.; Kin, J.-S.; Choi, Y.K.; Park, J.S.; Kim, S.W. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *Journal of Controlled Release* 1998; 54: 39–48.

Clements, B.A.; Incani, V.; Kucharski, C.; Lavasanifar, A.; Ritchie, B.; Uludag, H. A comparative evaluation of poly-L-lysine-palmitic acid and LipofectamineTM2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2007; 28: 4693–4704.

Crystal, R. G. Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success. *Science* 1995; 270: 404–410.

Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E.C.; Tilkins, M.L.; Price, P.J.; Ciccarone, V.C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004; 33: 95–103

Dhanoya, A.; Chain, B.M.; Keshavarz-Moore, E. The impact of DNA topology on polyplex uptake and transfection efficiency in mammalian cells. *Journal of Biotechnology* 2011; 155: 377–386.

Dodds, E.; Dunckley, M.G.; Naujoks, K.; Michaelis, U.; Dickson, G. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Therapy* 1998 5: 542–551.

Eliyahu, H.; Barenholz, Y.; Domb, A.J. Polymers for DNA delivery. *Molecules* 2005; 10(1): 34–64.

Elouahabi, A.; Ruyschaert, J.-M. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Molecular Therapy* 2005; 11: 336–347.

Fu, C.; Sun, X.; Liu, D.; Chen, Z.; Lu, Z.; Zhang, N.; Biodegradable Tri-Block Copolymer Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PLA-PEG-PLL) as a Non-Viral Vector to Enhance Gene Transfection. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 1371–1388.

Funhoff, A.M.; Nostrum, C.F.; Koning, G.A.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E.; Crommelin, D.J.A.; Hennink, W.E.; Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* 2004; 5:32–39

Gascón, A.R.; Pozo-Rodríguez A.; Solinís, M.A.; Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy - Tools and Potential Applications, Dr. Francisco Martin (Ed.), ISBN: 978-953-51-1014-9, InTech, 2013; DOI: 10.5772/52704. Available from: <http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/non-viral-delivery-systems-in-gene-therapy>.

Ginn, S.L.; Alexander, I.E.; Edelstein, M.L.; Abedi, M.R.; Wixon, J.; Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J Gene Med.* 2013; 15: 66–77.

Hill, I.C.R.; Garnett, M.C.; Bignotti, F.; Davis, S.S. In vitro cytotoxicity of poly(amidoamine)s: relevance to DNA delivery. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1427: 161–174.

Hornof, de la F. M.; Hallikainen M, Tammi R. H.; Urtti A. Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. **J Gene Med.** 2008; 10:70–80.

INTERNATIONAL STANDARD. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods 1992, (ISO 10993-5).

Jordan M, Elbayoumi T. Phosphorylcholine-based Biomimetic Coatings for Nanomedical Applications. **J Membra Sci Technol** 2013; 3: e113. doi:10.4172/2155-9589.1000e113.

Kadlecova, Z.; Baldi, Hacker, D.; Wurm, F.M.; Klok, H-A. Comparative Study on the In Vitro Cytotoxicity of Linear, Dendritic, and Hyperbranched Polylysine Analogues. **Biomacromolecules** 2012; 13: 3127 – 3137.

Kikushi, H., N.; Suzuki, N.; Ebihara, K.; Morita, H.; Ishii, Y.; Kikushi, A.; Sugaya, S.; Serikawa, T.; Tanaka, K. Gene delivery using liposome technology. **Journal of Controlled Release** 1999; 62(1–2): 269–277.

Kim, S.Y.; Cho, Y.W.; Kwon, I.C.; Kim, K.M.; Moon, D.H. “Chitosan Complex Containing pH Sensitive Imidazole Group and Preparation Method Thereof”. UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION, 2008, Patent n° WO/2008/007932, data:17/01/2008.

Kwoh, D.Y.; Coffin, C.C.; Lollo, C.P.; Jovenal, J.; Banaszczyk, M.G.; Mullen, P.; Phillips, A.; Amini, A.; Fabrycki, J.; Bartholomew, R.M.; Brostoff, S.W.; Carlo, D.J. Stabilization of poly- L -lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. **Biochimica et Biophysica Acta** 1999;1444: 171–190.

Lam, J.K.W.; Ma, Y.; Armes, S.P.; Lewis, A.L.; Baldwin, T.; Stolnik, S. Phosphorylcholine–polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery. **Journal of Controlled Release** 2004; 100: 293–312.

Leong, K.; Mao, H.-Q.; Truong-Le, V.L.; Roy, K.; Walsh, S. M.; August, J. T. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. **Journal of Controlled Release** 1998; 53:183–193.

Linden, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos avançados** 2010; 24(70).

Lin, C-W.; Jan, M-S.; K, J-H., S.; Hsu, L-J.; Lin, Y-S. Protective role of autophagy in branched polyethylenimine (25K)-and poly(L -lysine) (30–70K)-induced cell death. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 2012; 47: 865–874.

Lu, B., Xu, X.D.; Zhang, X.Z.; Cheng, S.X.; Zhuo, R.X. Low Molecular Weight Polyethylenimine Grafted *N*-Maleated Chitosan for Gene Delivery: Properties and *In Vitro* Transfection Studies. **Biomacromolecule** 2008; 9: 2594–2600.

Luten, J.; Nostrum, C.F.V.; Smedt, S.C.; Hennik, W.E. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. **Journal of Controlled Release** 2008; 126: 97–110.

Matte, U.; Giugliane, R. Terapia Gênica – Aspectos Técnicos in: Binsfeld, P.C. Biossegurança em Biotecnologia, 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Inteciência, 2004. Vol.1, 309p.

Midoux, P.; Monsigny, M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. **Bioconjug. Chem.** 1999; 10: 406–411.

Miyata, K.; Oba, M.; Kano M.R.; Fukushima, S.; Vachutinsky, Y.; Han, M.; Koyama, H. Miyazono, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. **Pharm. Res.** 2008; 25: 2924–2936.

Miyazawa, K. and Winnik, F.M. Solution Properties of Hydrophobically-Modified Phosphorylcholine-Based Polymers in Water and Mixed Solvents. **Macromolecules** 2002; 35: 9536–9544.

Mohan, R.R.; Tovey, J.C.K.; Sharma, A.; Tandon, A. Gene Therapy in the Cornea: 2005 – present. **Progress in Retinal and Eye Research** 2012; 31:43–64.

Muzzarelli, R. Chitin. **Oxford**: Pergamon Press, p105, 1977.

Nardi, N.B.; Teixeira, L.A.K.; Silva, E.F.A. Gene Therapy. **Ciência & Saúde Coletiva** 2002; 7(1): 109–116.

Nie, Y.; Zhang, Z.; Luo, K.; Li, L.; Ding, H.; Gu, Z. Synthesis, characterization and transfection of a novel folate-targeted multipolymeric nanoparticles for gene delivery. **J Mater. Sci. Mater. Med.** 2009; 20: 1849–1857.

Ohama, Y.; Heike, Y.; Sugahara, T.; Sakata, K.; Yoshimura, N.; Hisaeda, Y.; Hosokawa, M.; Takashima, S.; Kato, K. Gene Transfection into HeLa cells by Vesicles Containing Cationic Peptide Lipid. Biosc. **Biotechnol. Biochem.** 2005; 69: 1453–1458.

Oliveira, F.P.P.; Picola, I.P.D.; Tiera, V.A.O.; Shi, Q.; Fernandes, J.C.; Tiera, M. J. Synthesis, Characterization and the Charge Density Effects of Amino Derivatives of Chitosan on the “*in vitro*”. **Transfection Efficiency**. 2011.

Ortiz, R.; Melguizo, C; Prados, J.; Alvarez, P.J; Caba, O.; Rodriguez-Serrano, F.; Hita, F.; Aranega, A. New Gene Therapy Strategies for Cancer Treatment: A Review of Recent Patents. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, 2012; 7: 297–312.

Pack, D.W.; Hoffman, A.S.; Pun, S.; Stayton, P.S. Design e development of polymers for gene delivery. **Nature** 2005; 4:581–593.

Peppas, L.B. and Blanchette, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2004; 56: 1649–1659.

Picola, I.P.D.; **Estudo físico-químico de nanopartículas de DNA com derivados de quitosana contendo grupos fosforilcolina**. Dissertação (Mestrado) - UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto, 2009.

Qi, R.; Gao, Y.; Tang, Y.; He, R-R.; Liu, T-L.; He, Y.; Sun, S.; Li, B-Y.; Li, Y-B.; Liu, G. PEG-conjugated PAMA Dendrimers Mediate Efficient Intramuscular Gene Expression. **AAPS J.** 2009; 11(3): 395–405.

Reisch, A.; Voegel, J.-C.; Decher, G.; Schaaf, P.; Me'sini P. J. Sínteses de polieletrólitos contendo metades de fosforilcolina. **Macromol. Rapid Commun.** 2007; 28, 2217–2223.

Roy, K.; Ghosn, B.; Kasturi, S. Enhancement of polysaccharide-mediated nucleic acid delivery, 2009, Patent number: WO/2009/036022, data:19/03/2009.

Sato, T.; Ishii, T. and Okahata, Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials** 2001; 2001: 2075–2080.

Shim, M.S.; Kwon, Y.J. Acid-transforming polypeptide micelles for targeted nonviral gene delivery. **Biomaterials** 2010; 31: 3404–3413

Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 4^a ed., New York: John Wiley, c1981.

Somia, N.; Verma, I. Gene therapy: trials and tribulations. **Nat. Rev. Genet.** 2000; 1: 91–99.

Sun, J.; Luo, T.; Sheng, R.; Li, H.; Chen, S.; Hu, F.; Cao, A. Preparation of Functional Water-Soluble Low-Cytotoxic Poly(methacrylate)s With Pendant Cationic L -Lysines for Efficient Gene Delivery. **Macromol. Biosci.** 2013; 13:35–47.

Symonds, P.; Murray, J.C.; Hunter, A.C.; Debska, G.; Szewczyk, A.; Moghimi, S.M. Low and high molecular weight poly(LL -lysine)s/poly(LL -lysine)–DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. **FEBS Letters** 2005; 579: 6191–6198.

Thomas, C.E.; Ehrhardt, A.; Kay, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nature** 2003; 4: 346 – 358.

Tiera, M.J.; Qiu, X.; Bechaouch, S.; Shi, Q.; Fernandes, J.C.; Winnik, F.M. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine- Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions. **Biomacromolecules** 2006; 7: 3151–3156.

Toncheva, V.; Wolfert, M.A.; Dash, P.R.; Oupicky, D.; Ulbrich, K.; Seymour, L.W.; Schacht, E.H. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. **Biochimica et Biophysica Acta** 1998; 1380: 354–368.

Wang, W.; Yao, J.; Zhou, J.P.; Lu, Y.; Wang, Y.; Tao, L.; Li, Y.P. Urocanic acid-modified chitosan-mediated p53 gene delivery inducing apoptosis of human

hepatocellular carcinoma cell line HepG2 is involved in its antitumor effect in vitro and in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2008; 377(2): 567–572.

Ward, C.M.; Pechar, M.; Oupicky, D.; Ulbrich, K.; Seymour, L.W. Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo. **J Gene Med** 2002; 4: 536–547.

Ward, M.W.; 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** 2001; 97: 8.

Yue, Y e Wu, C. Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. **Biomater. Sci.** 2013; 1:152–170.

Zhang, X.; Oulad-Abdelghani, M.; Zelkin, A.N.; Wang, Y.; Haïkel, Y.; Mainard, D.; Voegel, J-C.; Caruso, F.; Benkirane-Jessel, N. Poly(L -lysine) nanostructured particles for gene delivery and hormone stimulation. **Biomaterials** 2010; 31: 1699–1706.