



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E COMPLEXAÇÃO COM PROTEÍNAS VISANDO A ENTREGA DE DNA PARA CÉLULAS DE MAMÍFERO

PALMA MM¹, SANTOS CHS¹, SECKLER MM¹, AZZONI AR¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo
E-mail para contato: adriano.azzoni@usp.br

RESUMO – *Uma das principais limitações ao desenvolvimento de vacinas de DNA é a baixa eficiência de entrega gênica. Em especial, isso ocorre devido às diversas barreiras físicas, enzimáticas e de transferência de massa que o DNA precisa superar para atingir o núcleo das células alvo. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e estudo de novos vetores de entrega gênica, formados por DNA plasmidial (pDNA), nanopartículas de ouro (NPAu) e a proteína recombinante T-Rp3 na forma de complexos ternários. As NPAu's foram sintetizadas utilizando-se citrato de sódio como agente redutor. Complexos formados por pDNA:T-Rp3:NPAu foram então produzidos e caracterizados por espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta. Complexos com T-Rp3 apresentaram tamanhos entre 135 e 307 nm, com potenciais zeta entre +10,6 e +27,2 mV. Estudos de transfecção, usando um pDNA modelo que codifica para a enzima repórter luciferease indicaram que a combinação de NPAu's com T-Rp3 tende a aumentar a eficiência de entrega gênica em células HeLa.*

1. INTRODUÇÃO

A vacinação gênica consiste na introdução de um ou mais genes de interesse em células de um paciente, de modo a induzir resposta e memória imunológica (Moraes *et al.*, 2008). Em geral, faz-se necessário o uso de vetores ou carreadores do material genético de interesse, uma vez que o DNA, nú, apresenta baixa capacidade de internalização celular e transporte até o núcleo (Favaro *et al.*, 2014). Os vetores de entrega gênica são classificados como virais ou não-virais. Os primeiros são vírus modificados geneticamente de modo a carregarem o gene de interesse aproveitando suas habilidades naturais de transdução, de forma a realizar a entrega para as células alvo de maneira eficiente. No entanto, apresentam elevado custo de produção e podem induzir a respostas imunológicas e inflamatórias graves nos pacientes (Favaro *et al.*, 2018). Já os chamados vetores não-virais consistem em todas as outras formas físicas e químicas de transportar e internalizar o material genético nas células alvo (Sun *et al.*, 2014). Normalmente, possuem menor eficiência que os vetores virais, resultado da dificuldade em transpor as várias barreiras físicas, enzimáticas e difusionais encontradas durante o transporte gênico ao núcleo das células (Favaro *et al.*, 2018).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido nanopartículas que simulam o comportamento de vetores virais ao infectarem uma célula, em geral através da incorporação de proteínas recombinantes que interagem com o DNA terapêutico e mimetizam interações moleculares feitas pelos vírus (Favaro *et al.*, 2014). Dentre essas proteínas está a T-Rp3, uma proteína modular capaz de interagir, condensar e facilitar o transporte de DNA plasmidial para as células (Favaro *et al.*, 2018). Mais recentemente, buscamos avaliar a combinação de proteínas com



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

nanopartículas de ouro. As NP Au's têm sido estudadas devido às suas numerosas funções biológicas e fácil metabolização, representando baixa citotoxicidade. As nanopartículas de ouro apresentam outras vantagens como alta estabilidade, habilidade de carrear genes, afinidade biológica, além de apresentarem características protetoras contra a degradação por nucleases (DeLong *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2013). Além disso, quando estas duas ferramentas são combinadas, as proteínas intermediam a ligação entre o pDNA e as NP Au's, devido aos valores potencial zeta de sinais opostos, aumentando a proteção do pDNA contra nucleases (DeLong *et al.*, 2009). Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência de nanopartículas formadas por DNA plasmidial, NP Au's e a proteína T-Rp3, com a finalidade de atuarem como vetores de entrega gênica. Buscou-se correlacionar a composição e as propriedades físico-químicas destas partículas com a eficiência de entrega gênica para células de mamífero cultivadas *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese das Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas de acordo com o protocolo proposto por Turkevich *et al.* (1951) através da redução do ouro por citrato de sódio. De acordo com este método, 95 mL de uma solução de 0,267 mM de cloreto de ouro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) foram aquecidos até a ebulição, sob vigorosa agitação. Ao atingir ebulição, adicionou-se 5 mL de uma solução de citrato de sódio tribásico dihidratado a diferentes concentrações, de modo a obter NP Au's de diferentes diâmetros e potenciais zeta (ambas as soluções preparadas em água milli-Q). A reação ocorreu por 15 minutos e então resfriou-se o ouro coloidal a temperatura ambiente.

2.2. Obtenção do DNA Plasmidial e da Proteína T-Rp3

Para a formação dos complexos ternários pDNA:proteína:NP Au, foi utilizado o plasmídeo modelo pVAX1Luc (4614 pb), descrito detalhadamente por Favaro *et al.* (2014). Bactérias *E. coli* (DH5 α) previamente transformadas com o plasmídeo foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 2 L, contendo 150 mL de meio LB (Luria-Bertani) e Kanamicina (30 $\mu\text{g/mL}$) sob uma agitação de 225 rpm e 37 °C overnight. Após o crescimento, o pDNA foi recuperado e purificado através do kit Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit (GE Healthcare, Suécia). A proteína recombinante T-Rp3 foi produzida e purificada a partir da expressão em células *E. coli* BL21(DE3), como descrito por Favaro *et al.* (2014).

2.3. Complexos pDNA:proteína:NP Au e Transfecção de Células HeLa

Para a formação e caracterização dos complexos, foram utilizadas, além das soluções de NP Au's com diferentes tamanhos de partícula, a solução de pDNA purificado, e solução de T-Rp3 na concentração de 1,0 mg/mL, bem como solução tampão Hepes 40 mM pH 6,5. Diferentes proporções mássicas de pDNA, T-Rp3 e NP Au's, respectivamente, foram preparadas para a formação dos diferentes complexos ternários: 1:15:4, 1:60:4, 1:80:4 e 1:60:8. A metodologia de formação e caracterização dos complexos ternários por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ) está descrita em Palma MM (2017). Os ensaios de transfecção foram realizados em placas para cultura de células HeLa com 24 poços (5 x 10⁴ cel/poço, em meio

DMEM, 10% SFB) segundo descrito por Palma MM (2017). Após a transfecção utilizando-se os diferentes complexos, as células foram incubadas por 48h e a atividade da enzima repórter luciferase foi determinada pelo kit *Luciferase Assay System* (Promega, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudos de Transfecção com as Nanopartículas pDNA:T-Rp3:NPAu

Primeiramente, buscamos avaliar e comparar o desempenho de entrega gênica de nanopartículas ternárias formadas pela complexação de pDNA, T-Rp3 e ouro (NPAu's) buscando-se correlacionar essa eficiência com as características das partículas, como composição, tamanho, polidispersidade e potencial zeta. A Figura 1 apresenta a eficiência de transfecção de células HeLa intermediada pelas diferentes partículas.

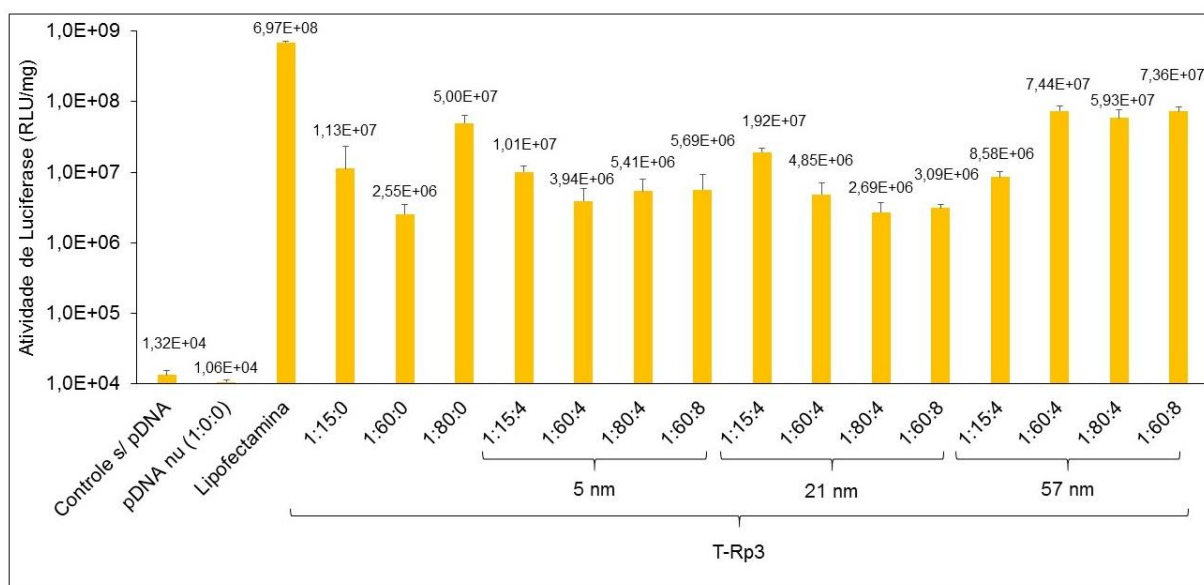


Figura 1 - Eficiência de transfecção de células HeLa utilizando nanopartículas formadas por pDNA:T-Rp3:NPAu, variando-se as proporções mássicas dos complexos ternários (indicadas abaixo do eixo x) e o diâmetro das nanopartículas de ouro (indicado abaixo das proporções). As barras de erro representam o desvio padrão de ensaios em triplicata.

Em geral, elevadas razões mássicas de pDNA com a proteína T-Rp3 já são suficientes para uma eficiente entrega do pDNA às células cultivadas *in vitro*. No entanto, a adição de NPAu's, em especial de maior diâmetro (57 nm), levou a um aumento da eficiência de entrega em algumas das condições avaliadas. No caso da proporção mássica de pDNA:T-Rp3 de 1:60, a incorporação de NPAu's aumentou em aproximadamente 29 vezes o valor da atividade da enzima repórter. Nossos estudos indicam que isso se deve principalmente a um aumento na eficiência de escape endossomal proporcionado pelo ouro coloidal (Palma MM, 2017).

3.2. Caracterização das Nanopartículas pDNA:T-Rp3:NPAu

A Tabela 1 apresenta a caracterização de nanopartículas pDNA:T-Rp3 formadas na



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

presença ou não de diferentes NPau's. A complexação com NPau's tende a levar ao aumento do diâmetro e polidispersidade, mas promove pequeno impacto sobre o potencial zeta, com a exceção do caso de NPau's menores, de 5 nm.

Tabela 1 - Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM), Polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta (ζ) de complexos ternários pDNA:T-Rp3:NPau formados a partir de diferentes relações mássicas e tamanhos de NPau. Os desvios padrão foram calculados a partir de triplicatas.

Relação Mássica	Diâmetro da NPau (nm)	DHM (nm)	Polidispersidade (PDI)	ζ (mV)
1:60:0	-	143 $\pm$ 6	0,240 $\pm$ 0,55	+18,9 $\pm$ 2,6
1:60:4	5	135 $\pm$ 14	0,721 $\pm$ 0,73	+10,6 $\pm$ 0,4
1:60:4	21	307 $\pm$ 14	0,268 $\pm$ 0,17	+27,2 $\pm$ 1,2
1:60:4	57	240 $\pm$ 23	0,447 $\pm$ 0,95	+16,9 $\pm$ 0,4

4. CONCLUSÃO

Nanopartículas formadas por pDNA combinado com T-Rp3 e NPau's de 57 nm apresentaram, em geral, eficiências de transfecção superiores aos complexos utilizando apenas pDNA combinado à proteína. Ensaios utilizando cloroquina indicaram que as NPau's exercem um importante papel no escape endossomal durante o processo de entrega, sendo adjuvantes potencialmente interessantes, merecendo o aprofundamento dos estudos.

5. REFERÊNCIAS

- DELONG, R.; AKHTAR, U.; SALLEE, M; et al. Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. *Biomaterials* v. 30, p. 6451-6459, 2009.
- FAVARO, MTP.; DE TOLEDO, MAS; ALVES, RF et al. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. *J. Biotech*, v. 173, p. 10-18, 2014.
- FAVARO, MTP; UNZUETA, U; DE CABO, M et al. Intracellular trafficking of a dynein-based nanoparticle designed for gene delivery. *Eur. J Pharm. Sc.* v. 112, p. 71-78, 2018.
- MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica. 1ª Edição. ed. [S.L.]: Editora ROCA, 2008.
- SUN, N.; LIU, Z.; HUANG, W.; TIAN, A.; HU, S. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, v. 89, p. 352-357, 2014.
- PALMA MM. Desenvolvimento de nanopartículas metal-proteína para a entrega de DNA em estudos de terapia e vacinação gênicas. Dissertação de Mestrado. Univ. São Paulo, 2017.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55-75, 1951.