



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



ENBEQ
2016

XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DNA-POTAMINA-AU PARA A ENTREGA DE DNA EM ESTUDOS DE TERAPIA E VACINAÇÃO GÊNICA

M. M. Palma¹, C. H. S. Santos¹, L. S. Schiavon¹, M. M. Seckler¹, A. R. Azzoni¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo
E-mail para contato: matheus.mlot@gmail.com

RESUMO – Um problema recorrente no desenvolvimento de vacinas de DNA e terapia genética é a baixa eficiência de transferência gênica. Isso ocorre devido às diversas barreiras físicas, enzimáticas e difusionais que o DNA precisa superar para chegar ao núcleo da célula. Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de novos vetores não-virais de entrega gênica, formados por DNA plasmidial (pDNA), nanopartículas de ouro (NPAu) e a proteína protamina na forma de complexos ternários. NPAu's foram primeiramente sintetizadas por redução com citrato de sódio apresentando diâmetros entre 21 e 57 nm, e potencial zeta entre -63 e +43 mV, dependendo das condições de síntese. Vetores formados por pDNA:protamina:NPAu foram então produzidos e caracterizados por espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta, sendo obtidos complexos com tamanhos entre 111 e 441 nm e potenciais zeta entre -127 e +28 mV, dependendo das relações mássicas de cada componente, tamanho das NPAu's e das forças iônicas e pH do tampão utilizados. Em breve essas nanopartículas serão avaliadas em suas eficiências de transfecção de células in vitro.

1. INTRODUÇÃO

A terapia gênica pode ser definida como o processo de tratamento de determinadas doenças através do transporte de material genético terapêutico para células específicas, suplementando ou substituindo a expressão de genes defeituosos (Stone, 2010). Nesse contexto, a escolha do carreador ou vetor que realizará este transporte tem papel fundamental (Khan, 2013), sendo baseada em fatores como o tipo de doença que se deseja tratar, o tipo de célula que se deseja atingir e considerando a necessidade de expressão do gene de interesse a longo ou curto prazo (Auduoy *et al.*, 2002).

Podemos classificar, de maneira geral, os vetores de entrega gênica como virais ou não-virais. Vetores virais são vírus modificados geneticamente de modo a conterem o material genético de interesse e, através de suas características naturais, são capazes de realizar o transporte gênico de maneira extremamente eficiente, obtendo assim, elevados níveis de transfecção. No entanto, estes vetores apresentam diversas restrições, tais como limitada capacidade de carregamento de DNA, estarem associados ocasionalmente a respostas imunológicas e inflamatórias graves, além de serem

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



ENBEQ
2016

XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

custosos e complexos de produzir (Wiethoff *et al.*, 2002). Por outro lado, vetores não-virais consistem em todas as outras formas físicas e químicas de internalizar o material genético. Mais significativamente, complexos formados com DNA, que simulam o comportamento viral (carreadores artificiais), tem recebido atenção especial, principalmente devido à sua facilidade de preparo, uso e maior segurança, apesar dos baixos níveis de transfecção geralmente obtidos. A baixa eficiência é resultado das inúmeras barreiras físicas, enzimáticas e difusionais encontradas durante o processo de transporte gênico ao núcleo das células. Surge, conseqüentemente, o desafio de desenvolver carreadores artificiais que consigam alcançar, ou até mesmo superar a eficiência de transfecção dos vetores virais, sendo não-imunogênicos e possíveis de preparar em uma escala de uso clínico, de maneira economicamente viável (Mastrobattista *et al.*, 2006).

Dentre as inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de vetores não-virais, dois compostos serão abordados nesse estudo, devido às suas vantagens específicas e que podem ser combinadas: o uso de nanopartículas de ouro e da proteína protamina. NP Au's têm sido intensamente estudadas devido às suas numerosas funções biológicas e fácil metabolização, representando baixa citotoxicidade. As nanopartículas deste material apresentam outras vantagens como boa estabilidade, alta habilidade de carrear genes, afinidade biológica, além de apresentarem características protetoras contra nucleases (Sun *et al.*, 2013, DeLong *et al.*, 2009). Já a protamina é uma proteína catiônica (ponto isoelétrico em torno de 12), extraída do esperma de salmão, que apresenta como principal função a ligação, proteção e condensação com o DNA, além de ser conhecida por transportar DNA do citoplasma para o interior do núcleo das células. Além disso, quando estas duas ferramentas são combinadas, a protamina intermedia a ligação entre o DNA e as NP Au's e garante a proteção do DNA contra nucleases (DeLong *et al.*, 2009). Estes dois compostos, portanto, apresentam características interessantes e que podem ser exploradas para o uso em terapia gênica.

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho é estudar sistematicamente a formação de vetores não-virais formados por nanopartículas de ouro, protamina e DNA plasmidial especificamente desenvolvido para fins de entrega gênica, bem como a caracterização físico-química destes complexos formados com diferentes características de NP Au's. Nesse contexto, está sendo desenvolvido um estudo sobre a síntese de nanopartículas de ouro com diferentes tamanho e potencial zeta, que serão utilizadas para a formação do vetor proposto, permitindo correlacionar suas propriedades físico-químicas com a eficiência de entrega gênica para células 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, a 100 °C, sob vigorosa agitação. Ao atingir esta temperatura, adicionou-se 5 mL de uma solução de 34 mM de citrato de sódio tribásico dihidratado (ambas as soluções preparadas

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



em água milli-Q). A reação ocorreu por 15 minutos e, após esse período, permitiu-se resfriar o ouro coloidal a temperatura ambiente. O volume da amostra foi completado com água de mesma pureza, para repor o volume de líquido evaporado durante o processo, obtendo-se uma solução com 5 mg de ouro em 100 mL de água.

De modo a obter nanopartículas de ouro com diferentes características de tamanho e potencial zeta, variamos a quantidade de citrato de sódio adicionada. O mesmo volume de 5 mL foi adicionado, porém de soluções mais ou menos concentradas do composto em questão. Foram testadas relações molares de 1:1,3; 1:2,8; 1:3,5; 1:4,0 e 1:13,4, além da citada inicialmente, 1:6,7. Estudamos portanto o efeito da adição de diferentes proporções ou razões molares do agente redutor citrato de sódio sobre o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e carga superficial das NPAu's, medidos através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) e potencial zeta (PZ), utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, EUA).

Para concentrar as nanopartículas sintetizadas que foram usadas nos complexos ternários, alíquotas de 1 mL foram colocadas em tubos Eppendorf e centrifugadas a 10.000g por 45 minutos, a 4 °C. Ao fim deste tempo, cuidadosamente, 800 µL do sobrenadante foram retirados utilizando-se uma micropipeta. O volume restante foi vortexado de modo a ressuspender as nanopartículas e obter uma solução cinco vezes mais concentrada.

2.2. Purificação do DNA Plasmidial

Para a formação dos complexos ternários pDNA-protamina-NPAu, foi utilizado o plasmídeo modelo pVAX1GFP, descrito detalhadamente por Azzoni *et al.* (2007). O pDNA, de tamanho 3697 pb, foi especificamente desenvolvido para vacinas de DNA e contém um promotor do citomegalovirus humano (CMV), gene repórter da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP), gene de resistência à Kanamicina e origem de replicação procariota pMB1. A figura 1 esquematiza a composição do plasmídeo:

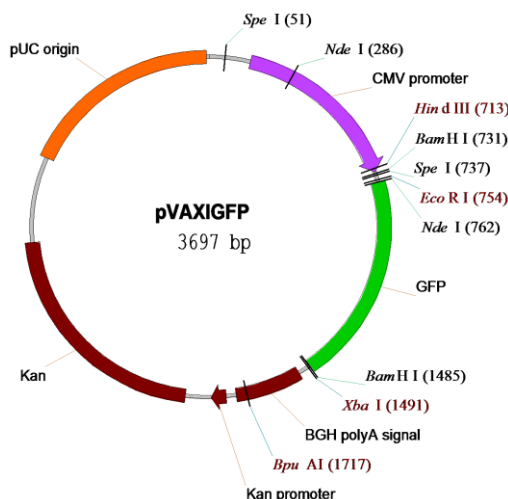


Figura 1 – Mapa do plasmídeo pVAX1GFP, contendo os diversos elementos genéticos que o compõe.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



ENBEQ
2016

XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

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 μ 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). Posteriormente, a concentração, bem como o grau de pureza da solução contendo o plasmídeo foram determinadas no espectrofotômetro DS-11, DeNovix. A concentração obtida foi de 394 ng/ μ L e a razão de absorbância a 260 nm/280 nm foi de 1,95, evidenciando uma elevada pureza do material genético de interesse.

2.3. Formação dos Complexos Ternários pDNA-protamina-NPAu

Para a formação e caracterização dos complexos, foram utilizadas, além das soluções de NPAu's com diferentes tamanhos de partícula, a solução de pDNA purificado, e duas soluções previamente preparadas de sulfato de protamina de concentração 10 e 1,0 mg/mL, bem como solução tampão Hepes, de concentração 40 mM e pH 6,5.

Cinco proporções mássicas de pDNA, protamina e NPAu's, respectivamente, foram escolhidas para serem utilizadas na formação de diferentes complexos ternários: 1:0:4; 1:0,5:4; 1:5:4; 1:20:4; 1:5:8. Além disso, variando-se as características das NPAu's em paralelo pode-se testar também sua influência na formação e características de tamanho e potencial zeta dos complexos formados em diferentes proporções mássicas.

Para cada complexo, adicionou-se primeiramente a um tubo Eppendorf um volume determinado de tampão de modo que, ao final da adição dos três componentes, obtivéssemos 50 μ L de complexo, o volume necessário a se obter 1 μ g de pDNA e a proporção desejada de protamina. Antes de adicionar as NPAu's, no entanto, incubávamos o pDNA, a protamina e o tampão por 10 minutos, permitindo que interagissem. Em seguida, adicionava-se o volume necessário para atingir a proporção desejada de ouro e incubava-se por mais 10 minutos. Então, 950 μ L de água ultrapura (milli-Q) era por fim adicionada e o volume total de 1 mL de complexo era transferido para as cubetas de análise de diâmetro no DLS. Após isso, um novo complexo com as mesmas proporções foi formado através do mesmo método e das mesmas quantidades, desta vez para ser submetido à análise do potencial zeta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das NPAu's

No objetivo de nosso estudo, buscamos avaliar e comparar o desempenho de entrega gênica de nanopartículas ternárias formadas pela complexação de pDNA, protamina e ouro (NPAu's) no sentido de correlacionar essa eficiência com as características das partículas, como tamanho, polidispersidade e carga. Por esse motivo, logo de início buscamos adaptar e desenvolver metodologias de síntese de NPAu's de forma a podermos testar diferentes tamanhos dessas partículas na formação dos

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



complexos ternários.

A Figura 2 ilustra o perfil de diâmetros hidrodinâmicos médios de NP_{Au}'s obtidos a partir da adição de diferentes proporções molares de citrato de sódio adicionado ao cloreto de ouro durante a reação de síntese.

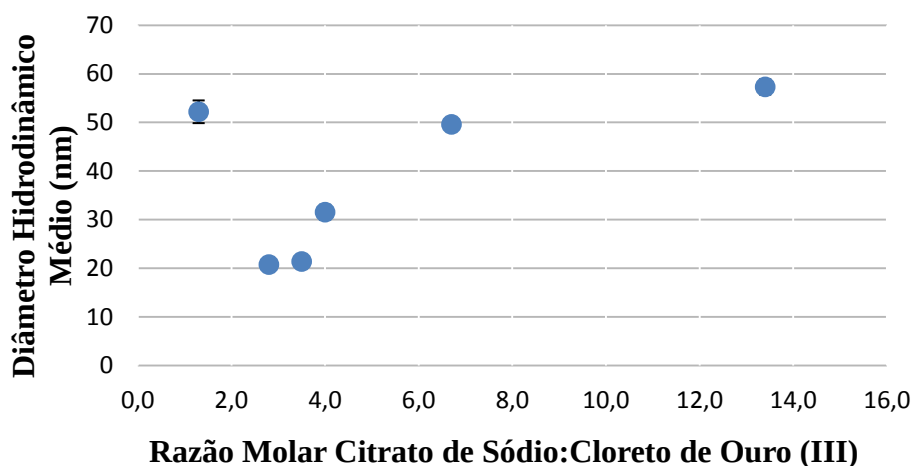
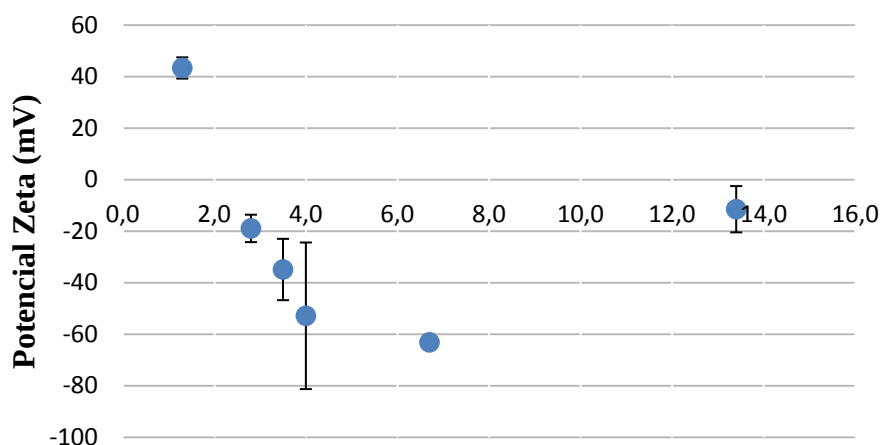


Figura 2 – Diâmetro hidrodinâmico médio de NP_{Au}'s em função da razão molar entre cloreto de ouro (III) e citrato de sódio utilizada nas sínteses. As barras representam o desvio padrão de três replicatas.

Tanto para os valores maiores como para o menor valor de concentração de citrato de sódio, os diâmetros das nanopartículas metálicas apresentam tendência a um maior valor, estando de acordo com as primeiras observações de Turkevich. O citrato, além de agente redutor, apresenta também um importante papel na estabilidade das partículas. Íons citrato rodeiam as NP_{Au}'s, mantendo-as estáveis e, portanto, a ausência destes causa aglomeração do ouro, apresentando valores de diâmetro maiores. Por outro lado, o excesso de citrato de sódio também causa um aumento das nanopartículas de ouro, pois, a partir da proporção 1:6,7 percebe-se uma segunda rota de formação das nanopartículas. Para proporções menores que esta, durante a síntese, observa-se que a solução se torna, num primeiro momento, azul e, ao final, vermelha. Para proporções maiores, no entanto, a solução se torna vermelha sem esta etapa intermediária. Ocorrem dois mecanismos distintos, portanto: um em que as partículas nucleiam, se aglomeram e depois se separam (proporções menores) e outro que segue a rota clássica de cristalização: nucleação e crescimento (proporções maiores), conforme descrito previamente por Ji *et al.*, 2007. Sendo assim, obteve-se um valor mínimo de diâmetro hidrodinâmico médio para quantidades mais baixas, porém não na menor testada. Na proporção molar 1:2,8, obteve-se o menor valor, de 21 nm, enquanto os maiores valores foram na proporção de 1:13,4, com 57,3 nm.

Para uma melhor compreensão dos efeitos da adição de citrato supracitados, deve-se analisar a Figura 3, que apresenta os valores de potencial zeta de acordo com as razões molares dos reagentes.



Razão Molar Citrato de Sódio: Cloreto de Ouro (III)

Figura 2 – Potencial zeta de NPAu's em função da razão molar entre cloreto de ouro (III) e citrato de sódio utilizada nas sínteses. As barras representam o desvio padrão de três replicatas.

Como se pode observar, para quantidades baixas de citrato de sódio, há um aumento considerável no valor do potencial zeta, chegando a valores positivos e, após uma acentuada diminuição (podendo chegar a menos que -60 mV), uma nova perda de estabilidade, com proporções molares maiores e valores de potencial zeta mais próximos de zero. Tal efeito é interessante ao permitir a formação de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos (21 e 57 nm) e potenciais zetas próximos (-19 e -11 mV), como podemos observar ao sintetizar AuNPs nas proporções 1:2,8 e 1:13,4, respectivamente.

3.2. Caracterização dos Complexos Ternários pDNA:Protamina:NPAu

A partir das características obtidas em diferentes sínteses de NPAu's, utilizamos duas delas para a formação e caracterização dos complexos ternários. Foram escolhidas as nanopartículas de tamanho próximo a 20 nm e 60 nm, sintetizadas com as proporções 1:2,8 e 1:13,4, respectivamente. Deste modo, poderíamos analisar o efeito do tamanho das nanopartículas de ouro sobre os complexos, mantendo um valor de potencial zeta próximo entre si, negativo. Este potencial zeta é do maior interesse para os estudos realizados, pois a carga positiva da proteína protamina permitiria uma melhor mediação da formação do complexo, atraindo tanto pDNA quanto NPAu's. As Tabelas 2 e 3 apresentam, respectivamente, o diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta de complexos formados a partir de diferentes proporções mássicas de pDNA:protamina:NPAu para estes dois tipos de ouro coloidal escolhidos. Como os valores de diâmetro das nanopartícula de ouro apresentaram leves variações de síntese para síntese, os valores exatos para as NPAu's (DH_{NPAu}) utilizadas são apresentados juntamente com a Tabela.

Tabela 1 – Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de complexos ternários formados com diferentes proporções mássicas de pDNA, protamina e NP Au

Proporção mássica (pDNA:protamina:NP Au)	DHM _{NP Au} = 26 nm	DHM _{NP Au} = 70 nm
	DHM (nm)	DHM (nm)
1:0:4	138 ± 1,2	111 ± 9,6
1:0,5:4	182 ± 20	158 ± 42
1:5:4	441 ± 51	310 ± 101
1:20:4	385 ± 77	314 ± 80
1:5:8	354 ± 43	277 ± 29

O aumento de tamanho das NP Au's ocasionou uma diminuição no tamanho dos complexos em todos os casos. Para compreendermos melhor os efeitos das diferentes proporções mássicas, bem como das diferentes nanopartículas de ouro sobre a formação dos complexos, deve-se levar em consideração também o potencial zeta destes complexos, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Potencial zeta (PZ) de complexos ternários formados com diferentes proporções mássicas de pDNA, protamina e NP Au

Proporção mássica (pDNA:protamina:NP Au)	DHM _{NP Au} = 25,9 nm	DHM _{NP Au} = 70,4 nm
	PZ (mV)	PZ (mV)
1:0:4	-123 ± 2,5	-80 ± 8,4
1:0,5:4	-127 ± 9,3	-23 ± 26
1:5:4	+5,8 ± 23	-46 ± 20
1:20:4	+16 ± 13	+11 ± 5,0
1:5:8	-9,3 ± 23	+28 ± 23

Apesar dos altos valores de desvio padrão obtidos em algumas condições, observa-se que a adição de protamina em pequenas quantidades, representada pela proporção 1:0,5:4, provoca pouca alteração no tamanho dos complexos ternários, se comparada aos outros casos. Além disso, esta mesma variação na adição de protamina provocou pouca ou praticamente nenhuma (caso da NP Au menor) mediação de ligação de NP Au com pDNA, evidenciado pelos valores próximos de potencial zeta. O aumento da sua proporção, no entanto, causa dois comportamentos diferentes, dependendo do tamanho das NP Au's. Para diâmetros maiores da nanopartícula de ouro, o potencial zeta voltou a diminuir, evidenciando possivelmente que maiores quantidades de ouro se ligaram ao complexo. Um novo aumento da protamina causa aumento do potencial zeta para os dois casos, demonstrando uma maior influência da proteína do que dos outros dois componentes. Futuramente, pretendemos aumentar ainda mais a proporção mássica da protamina no complexo, na busca por partículas menores (200 – 400 nm) e de alto valor de potencial zeta (20 – 30 mV), mais adequadas para a transfecção de células em cultura.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

4. CONCLUSÕES

Com os mecanismos de síntese e as características das nanopartículas de ouro bem estabelecidos, foi possível estudar o efeito de NPAu's com diferentes características sobre o processo de formação de complexos ternários formados com protamina e pDNA. Observou-se que, além das proporções, o tamanho das nanopartículas de ouro também tem uma influência característica do complexo, assim, nanopartículas de maior tamanho causam uma diminuição no diâmetro dos vetores formados, bem como um aumento no potencial zeta, na maioria das vezes.

As próximas etapas desse estudo envolvem avaliar a eficiência de transfecção em células de mamífero dos complexos caracterizados. Através da quantificação por citometria de fluxo da expressão da proteína repórter GFP, contida no pDNA, será possível determinar o nível de transfecção alcançado pelos complexos ternários formados. Assim, espera-se obter relações que permitam compreender como essas características influenciam no transporte do complexo do exterior da célula até sua entrada ao núcleo, ajudando na compreensão desses mecanismos.

5. REFERÊNCIAS

- AUDOUY, S.; DE LEIJ, L.; HOEKSTRA, D.; MOLEMA, G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm. Res.*, v. 19 (11), p. 1599-1605, 2002.
- AZZONI, A.; RIBEIRO, S.; MONTEIRO, G., PRAZERES, D. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J. Gene Med.*, v. 9, p. 392-402, 2007.
- DELONG, R.; AKHTAR, U.; SALLEE, M.; PARKER, B.; BARBER, S.; ZHANG, J.; CRAIG, M.; GARRAD, R.; HICKEY, A.; ENGSTROM, E. Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. *Biomaterials* v. 30, p. 6451-6459, 2009.
- JI, X.; XIANGNING, S.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X., Size control of gold nanoparticles in citrate reduction: the third role of citrate, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 129, p. 13939-13948.
- KHAN, K., DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*. v. 3 (1), p. 26-35, 2013.
- MASTROBATTISTA, E.; VAN DER AA, E.; HENNIK, W.; CROMMELIN, D. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature*, v. 5, p. 115-121, 2006.
- STONE, D. Novel viral vector systems for gene therapy. *Viruses*, v. 2, p. 1002-1007, 2010.
- 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.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P., HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Disc. Faraday Soc.*, v. 11, p. 55-75, 1951.
- WIETHOFF, M.; MIDDAUGH, C. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.*, v. 92 (2), p. 203-217, 2003.