

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
UFABC

BACHARELADO EM QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANNA CAROLINA DALL ANEZE FERREIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
POLIPLEXOS FORMADOS A PARTIR DA COMPLEXAÇÃO
DE DNA E POLIETILENOIMINA (PEI)**

SANTO ANDRÉ
ABRIL DE 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
UFABC

BACHARELADO EM QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANNA CAROLINA DALL ANEZE FERREIRA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Química como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

SANTO ANDRÉ
ABRIL DE 2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANNA CAROLINA DALL ANEZE FERREIRA

ALUNA

Anna Carolina Dall Aneze Ferreira

Assinatura _____

:

ORIENTADOR

Prof. Dr. Fernando Carlos Giacomelli

Assinatura _____

RESUMO

Este trabalho visou produzir e caracterizar poliplexos formados a partir da complexação de ctDNA com o polímero catiônico polietilenoimina (PEI), que possuem potencial aplicação em terapia genética. Foram estudados os poliplexos formados pelo uso do polímero com peso molecular médio de 1,2 kDa e 25,0 kDa, sendo produzidos sistemas com razão N/P entre 0 e 20, através da mistura de diferentes proporções das soluções estoque de PEI e DNA. A eficiência da complexação foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, mostrando maior eficiência para PEI 25 kDa em razões N/P menores (0,5 e 1). A análise por dicroísmo circular mostrou alterações dos espectros, apresentando desvio para o vermelho e alteração na intensidade dos picos, indicando enfraquecimento das interações essenciais para a organização das moléculas de DNA. Os espectros UV-Vis não mostram grandes alterações no máximo de absorção, apresentando apenas um pequeno desvio para PEI 25,0 kDa. Sendo assim, pode-se dizer que as cadeias de DNA se encontram ainda na conformação B e que a interação PEI/DNA ocorre por forças eletrostáticas. Já as demais propriedades físico-químicas foram estudadas através de espalhamento de radiação: SDLS (espalhamento de luz dinâmico e estático) e ELS (espalhamento de luz eletroforético), que possibilitaram a determinação do tamanho e estrutura das nano partículas, sendo elas o raio hidrodinâmico (R_H), raio de giração (R_G), distribuição de tamanhos, forma geométrica (R_H/R_G) e carga superficial. O valor de R_H para razão N/P=20 ficaram próximos a 70 nm para ambos os polímeros. Os valores encontrados para o potencial ζ indicam carga superficial positiva a partir de N/P=2 para ambos pesos moleculares, indicando a possibilidade de aderência à superfície negativa das células. Os resultados obtidos para a relação entre R_H e R_G indicam a formação de partículas esféricas ($\rho \approx 0,9$) e hidratadas. A análise dos dados de DLS mostraram distribuição única de tamanhos e ocorrência de movimento difusivo.

Palavras Chave: poliplexos, polietilenoimina, DNA, nanopartículas

Sumário

1. Introdução	6
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. Metodologia	12
3.1 Fabricação dos Sistemas Nanoestruturados	12
3.2 Avaliação da Eficiência de Complexação e Mudanças Conformacionais	12
3.2.1 Eletroforese em Gel de Agarose	12
3.2.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	13
3.2.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	13
3.3 Dimensão, Estrutura, Forma e Carga superficial	13
3.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	13
3.3.2 Espalhamento de Luz Estático (SLS)	15
3.3.3 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)	15
4. Resultados e Discussão	16
4.1 Complexação de DNA	16
4.2 Evolução Estrutural durante a Formação dos Poliplexos	18
4.3 Caracterização Detalhada dos Poliplexos Produzidos a N/P = 20	20
4.4 Conformação do DNA após a Compactação	21
5. Conclusão	24
6. Referências Bibliográficas	25

1. Introdução

A terapia genética é um método terapêutico promissor, que tem como princípio a transferência de versões funcionais de um determinado gene para as células, de forma a substituir o material genético defeituoso, ou tornar possível a expressão de um gene ausente.(LÄCHELT, 2015) A técnica apresenta grande potencial para tratamento de doenças graves relacionadas a deficiências genéticas, câncer, doenças neurodegenerativas ou infecções virais, sendo capaz também de promover a produção de proteínas responsáveis por prevenir e tratar doenças adquiridas.(ROLLAND, 2005)

Um dos principais fatores limitantes da funcionalidade da terapia genética se relaciona à internalização celular dos ácidos nucleicos. Dois fatores são preponderantes para a internalização das moléculas de DNA: as características da molécula de DNA, principalmente a presença de cargas negativas, que tornam difícil a internalização sem o auxílio de agentes externos, e a grande susceptibilidade das moléculas à degradação, tanto no meio extracelular quanto intracelular.(LÄCHELT, 2015)(LUO, 2000)

Para que a transferência do material genético ocorra de forma eficiente, é necessário o uso de agentes carregadores, capazes de condensar o DNA, e estáveis o suficiente para tornar possível a internalização para o núcleo celular sem grandes perdas devido à degradação. Além disso, para que a transfecção seja eficiente, várias etapas devem ser mediadas pelo vetor, como: condensação do DNA, internalização celular, escape endossomal, migração através do citoplasma e internalização nuclear.

No processo de transfecção, as partículas contendo o DNA se aderem à superfície celular e são internalizados pela célula via endocitose. O baixo pH e as enzimas presentes nos endossomos e lisossomos geralmente causam degradação dos complexos e do DNA aprisionado. Uma vez superada a etapa de endocitose, o DNA deve se dissociar dos complexos formados,

de forma a ser liberado e conduzido para o interior do núcleo. A representação esquemática do processo de transfecção é mostrado na Figura 1.(LÄCHELT, 2015)

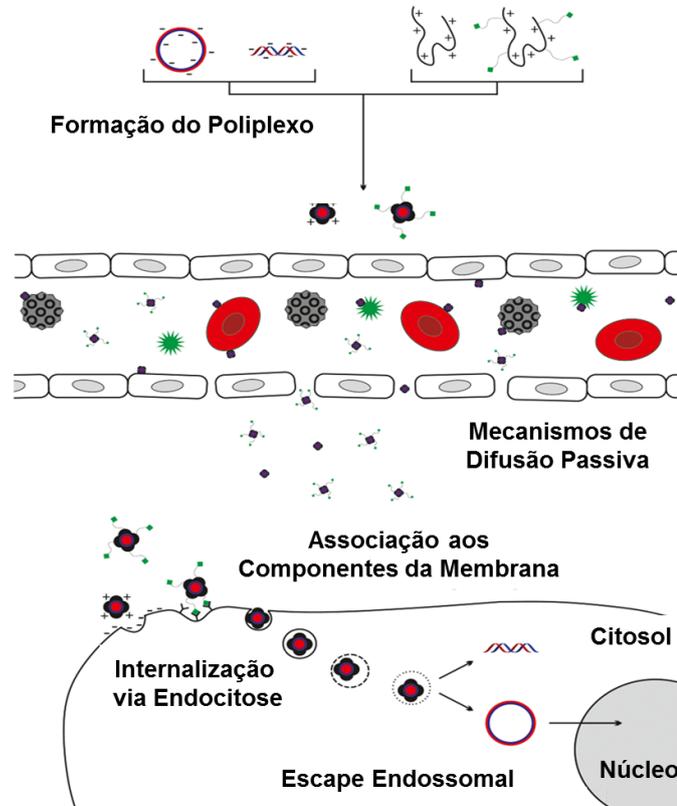


Figura 1. Representação esquemática de transfecção gênica mediada por um políplexo. (Figura adaptada. (LÄCHELT, 2015)

Existem duas classes de carreadores para material genético: vetores virais e vetores não virais. Os vetores virais, como o retrovírus e o adenovírus, apresentam grande eficiência no carregamento e expressão do DNA, graças à grande especialização adquirida pela evolução dos vírus.(LÄCHELT, 2015; LUO, 2000) Aproximadamente dois terços dos testes clínicos realizados até hoje se basearam em vetores virais.(LÄCHELT, 2015) Apesar de sua grande eficiência, os vetores virais apresentam uma série de desvantagens em sua aplicação. Entre elas estão a limitada capacidade de carregamento de DNA, toxicidade, respostas imunogênicas e

inflamatórias, e restrições em sua capacidade de agir somente sobre um grupo específico de células.(LÄCHELT, 2015; LUO, 2000)

Conseqüentemente, vetores não virais têm sido vistos como alternativas mais seguras e mais vantajosas do ponto de vista de estabilidade, produção e armazenamento. Estes sistemas envolvem várias classes de carregadores, como agentes de transfecção baseados em lipídios ou nanopartículas inorgânicas, fabricadas com ouro, sílica ou nanotubos de carbono. Outra classe de agentes carregadores se baseia em polímeros. Destes, os polímeros catiônicos são considerados promissores pois apresentam dimensões na mesma escala de grandeza da molécula de DNA e podem formar complexos *via* atração eletrostática.(LÄCHELT, 2015)

As nanoestruturas formadas pela complexação de ácidos nucleicos com polímeros catiônicos recebem o nome de poliplexos. A reação de complexação é entropicamente favorável, graças a interação iônica entre o ácido nucleico, que contém grande quantidade de cargas negativas, devido a presença dos grupos fosfato, e o polímero catiônico, que contém grupos amina (Figura 2).(ALATORRE-MEDA *et al.*, 2010; LÄCHELT, 2015) A eficiente condensação do DNA está relacionada à proporção entre cátions e ânions presentes no polímero e no ácido nucleico, respectivamente. Sendo assim, estes sistemas são preparados de acordo com a razão N/P, que é a razão molar entre o número de átomos de nitrogênio presentes no polímero e número de átomos de fósforo presentes no DNA. Dependendo da razão N/P, os poliplexos podem estar carregados positivamente, e desta forma se aderem à superfície celular negativamente carregada e são internalizados pela célula via endocitose. O baixo pH e as enzimas presentes nos endossomos e lisossomos geralmente causam degradação dos complexos e do DNA aprisionado. Uma vez superadas as etapas de endocitose, o DNA deve se dissociar dos complexos formados, de forma a ser liberado no citoplasma e conduzido para o interior do núcleo.(LÄCHELT, 2015)

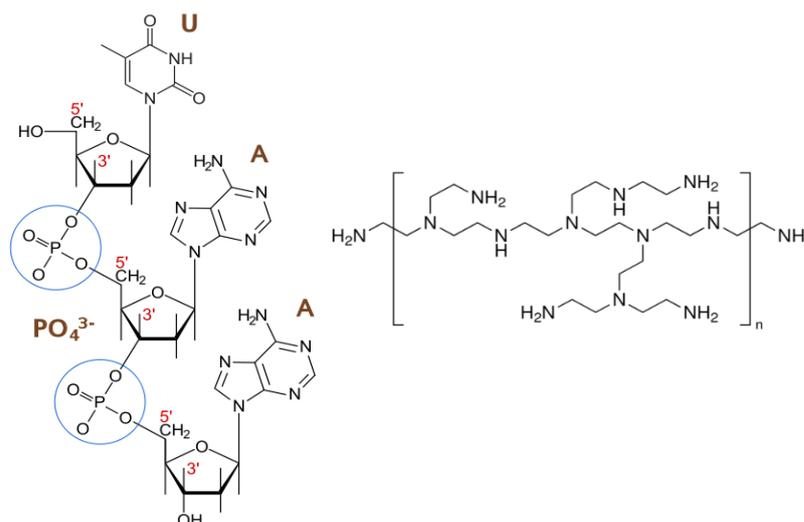


Figura 2. Estrutura molecular do DNA (esquerda); representação do monômero do polímero catiônico polietilenoimina (PEI) (direita).

Dentre os vários vetores não virais estudados, o polímero catiônico polietilenoimina (PEI) tem papel de destaque. Este polímero conta com características essenciais para a transfecção, como a condensação do DNA e a evasão do endossomo, apresentando resultados positivos em culturas celulares e aplicações *in vivo*. Trata-se de um polímero que tem sido estudado a algum tempo. A principal motivação deste trabalho foi estudar possíveis influências da massa molecular do polímero nas dimensões e estruturas dos poliplexos formados, bem como tê-lo como controle para futuras investigações utilizando copolímeros em bloco inéditos.

As propriedades do PEI também levaram Behr e col. (BEHR, 1997), em 1997, a apresentar a hipótese da “esponja de prótons” para o escape endossomal. Esta teoria baseia-se na grande capacidade tamponante do PEI ramificado, por apresentar grupos amina primárias ($pK_a = 6,4$), secundárias ($pK_a = 9,5$) e terciárias ($pK_a = 4,3$). (PARK, 2006) Desta forma, aminas que se encontram desprotonadas no pH extracelular são capazes de absorver prótons presentes no interior dos endossomos e lisossomos (meio ácido), o que leva ao bombeamento de mais prótons para o interior da organela, que ocorre concomitantemente à entrada de íons cloreto, causando inchamento osmótico, resultado da entrada de água de um meio menos concentrado para o meio mais concentrado (interior da organela). Combinado a isso, a repulsão entre os

grupos amina protonados promove o inchamento dos poliplexos. Estes processos levam à desestabilização da organela, levando à liberação dos poliplexos para o citoplasma.(BEHR, 1997) O fenômeno está representado na Figura 3 e é o mecanismo atualmente mais aceito para explicar a fuga endossomal de DNA. A fuga endossomal pelo fenômeno “esponja de prótons” não é observada para as versões lineares do PEI, sendo então a versão ramificada mais interessante para estudos de transfecção de DNA.

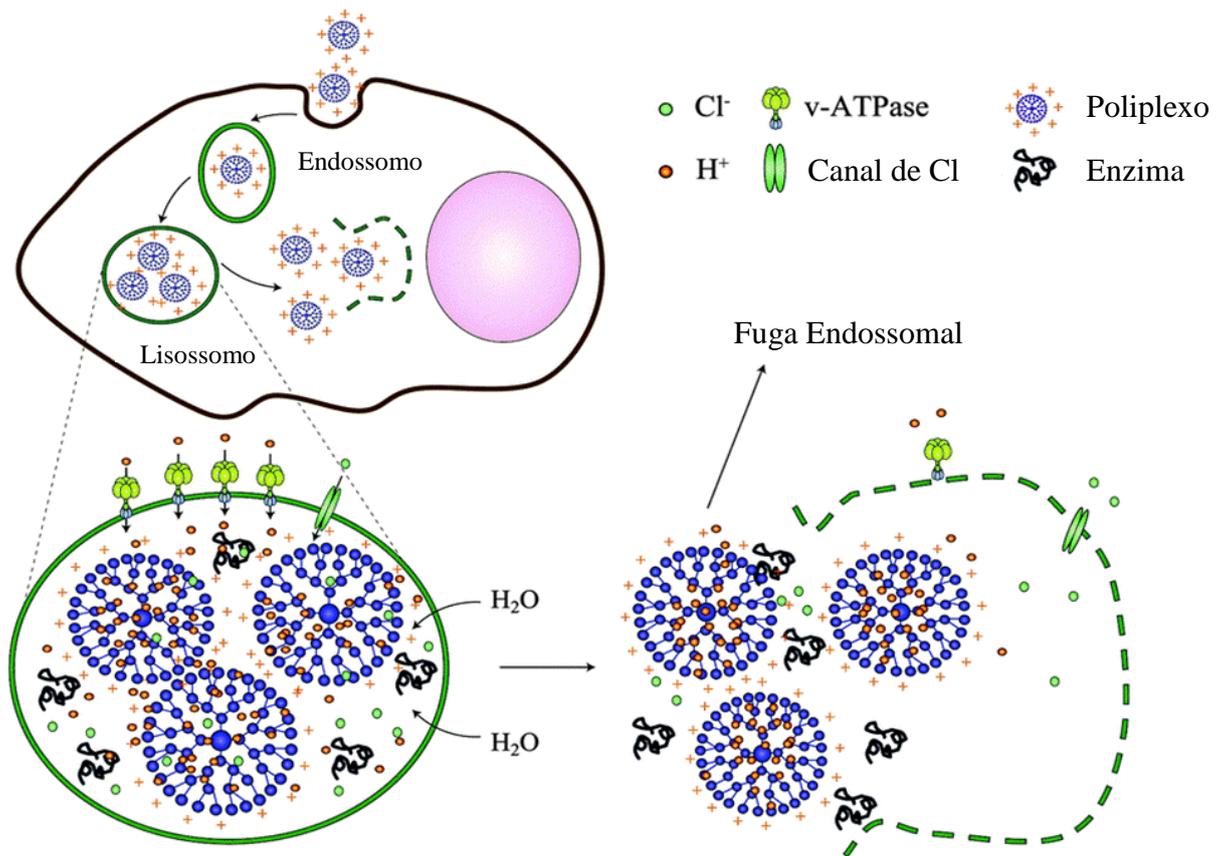


Figura 3. Fuga endossomal - Representação do fenômeno esponja de prótons (Figura adaptada de Varkouhi, 2011).(VARKOUHI *et al.*, 2011)

O polímero polietilenoimina (PEI) pode se apresentar nas formas linear e ramificada, estando disponível comercialmente com massa molecular desde 700 Da até 800 kDa. A massa molecular é um fator de importante influência no processo de complexação e citotoxicidade de poliplexos. Diferentes pesos moleculares formam partículas com diferentes diâmetros, cargas

superficiais e tendências à agregação.(KUNATH *et al.*, 2003) O raio hidrodinâmico da partícula, por exemplo, pode variar de 6 nm (complexação com siRNA) até algumas centenas de nanômetros, em poliplexos contendo diversas cópias do ácido nucleico, sendo que partículas muito pequenas são rapidamente removidas pelos rins, enquanto que partículas maiores (com até 400 nm) são suscetíveis à acúmulo em órgãos tais com o fígado.(LÄCHELT, 2015) Desta forma, o estudo das propriedades físico químicas das nanopartículas formadas a partir de diferentes polímeros e suas interações com o meio biológico é crucial para a compreensão da biodistribuição e farmacocinética dos poliplexos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Produzir sistemas conhecidos como poliplexos a partir da complexação de DNA e polications e determinar suas propriedades físico-químicas. Desta maneira, o objetivo esteve focado no contato experimental com diversas técnicas de caracterização de sistemas dimensionados na escala nanométrica.

2.2 Objetivos Específicos

- Fabricar poliplexos a partir da complexação de polietilenoimina (PEI) e DNA utilizando polietilenoimina (PEI) com massas moleculares de 1,2 kDa e 25 kDa (sistema controle);
- Avaliar eficiência de complexação a partir de análises de eletroforese em gel de agarose;
- Determinar a estrutura e dinâmica dos sistemas a partir das técnicas de espalhamento de luz dinâmico e estático (SDLS) e ELS (espalhamento de luz eletroforético)
- Avaliar ocorrência de mudanças conformacionais em virtude do processo de complexação a partir de medidas de dicroísmo circular (DC) e espectroscopia UV-Vis.

3. Metodologia

3.1 Fabricação dos Sistemas Nanoestruturados

Foram produzidos poliplexos a partir de polietilenoimina (PEI) ramificado com pesos moleculares de 1,2 kDa e 25,0 kDa (Sigma Aldrich) e DNA de timo de bezerro (ctDNA) (Sigma Aldrich). Primeiramente foram preparadas as soluções estoque dos polímeros e do DNA, ambos solubilizados em água ultrapura MilliQ®. A solução de ctDNA foi preparada em concentração final de 1 mg.mL⁻¹. Já os polímeros foram solubilizados em água, e tiveram seus pHs ajustados para 7,4 utilizando soluções estoque de HCl e NaOH.

Os sistemas foram preparados utilizando-se diferentes proporções polímero/DNA (razão N/P). O cálculo da razão N/P considerou que cada unidade de repetição do DNA corresponde a 330 g mol⁻¹ e contém um grupo fosfato, e cada 43 g mol⁻¹ de PEI contém um grupo amina. A partir destes dados foram calculadas as adições de PEI necessárias para cada razão, considerando-se uma solução 0,1 mg.mL⁻¹ de ctDNA. Os sistemas estudados foram preparados para as seguintes razões N/P: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 20,0 e foram analisados imediatamente após o preparo.

3.2 Avaliação da Eficiência de Complexação e Mudanças Conformacionais

3.2.1 Eletroforese em Gel de Agarose

A mobilidade eletroforética dos poliplexos polímero/DNA em função da razão N/P foi mostrada por eletroforese em gel de agarose. Após 60 minutos de incubação, 5 µL da solução de poliplexo contendo 1 ng de ctDNA foi misturado com 1 µL de solução tampão de glicerol, que assegura que as amostras entrem no poço pela força da gravidade, devido ao seu alto peso molecular. As amostras foram aplicadas num gel de agarose 1%, contendo 3 mL of GelRed™ (Biotium, California, Estados Unidos) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Os experimentos

foram realizados em agarose (1%), a 100 V por 60 minutos e a visualização do DNA foi feita com iluminação UV (254 nm). O padrão de 1 kb de marcador molecular de DNA (Thermo Scientificar, Mannatan, Estados Unidos) foi utilizado para marcar o tamanho do DNA.

3.2.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 utilizando-se uma cubeta de quartzo (*Hellma*, Müllheim, Alemanha) de 400 μL e 1,0 mm de caminho óptico e soluções de políplexos em N/P = 20, preparados a partir de uma solução de ctDNA 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A absorção de radiação circularmente polarizada à direita e à esquerda foi registrada no intervalo de 350 nm - 230 nm com resolução de 0,5 nm, sendo o processo repetido 8 vezes para cada amostra no intuito de reduzir o ruído associado. Medidas de água ultrapura MiliQ® foram utilizadas como branco em todos os experimentos realizados.

3.2.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Foram preparados políplexos variando a razão N/P a partir de uma solução padrão de ctDNA 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água MiliQ®. Nestes casos, 1 ml de solução de políplexo foi utilizada para preencher uma célula de quartzo de 10 mm. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta visível modelo Cary 50 (Varian), e todos os espectros foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm em temperatura ambiente e corrigidos pela subtração do fundo referente ao solvente (água).

3.3 Dimensão, Estrutura, Forma e Carga superficial

3.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas utilizando-se o instrumento ALV/CGS-3 consistindo em um laser de HeNe polarizado (22mW) operando em comprimento de onda $\lambda = 633 \text{ nm}$, equipado com um correlacionador digital ALV 7004 e um

par de detectores APD operando em modo pseudo-correlação cruzada. As amostras foram acondicionadas em cubetas de vidro de 10 mm de diâmetro e mantidas a temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Funções de correlação temporal foram obtidas na região angular 30° - 150° e a função monitorada a 90° foi ajustada utilizando-se o método de Cumulantes de acordo com a Equação 1.

$$\ln g_1(t) = \ln A - \Gamma t + \frac{\mu_2}{2} t^2 \quad (1)$$

onde A é a amplitude da função de correlação e Γ é a taxa média de decaimento, que em um sistema suficientemente diluído está relacionada à difusão. O parâmetro μ_2 é chamado de cumulante de segunda-ordem.

Através do valor de Γ obtido da análise pode-se determinar o coeficiente de difusão (D) da partícula por meio da relação com o vetor de espalhamento (q).

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (2)$$

O módulo do vetor de espalhamento é dado pela relação:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3)$$

sendo n o índice de refração do solvente, θ o ângulo de espalhamento e $\lambda = 633 \text{ nm}$ é o comprimento de onda da radiação utilizada. Finalmente, a partir de um valor de D , é possível determinar o raio hidrodinâmico (R_H) do sistema espalhante através da relação de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do solvente. Além disso, a análise de Cumulantes gera o parâmetro μ_2 . Este parâmetro foi utilizado para calcular a distribuição de tamanho das nanopartículas (μ_2/Γ^2) que está relacionado com a

largura de distribuição da taxa de decaimento monomodal. Para confirmar a distribuição monomodal das nanopartículas, as funções de correlação temporal também foram analisadas utilizando-se o algoritmo CONTIN (incorporado ao programa ALV Correlator Software) o qual utiliza a transformação inversa de Laplace de acordo com a Equação 5.

$$g_2(t) - 1 = \beta \left[\int A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \right] \quad (5)$$

onde t é o tempo de decaimento da função de correlação e β é um parâmetro instrumental. A função resultante é uma distribuição de tempos de relaxação geralmente constituído de picos representado processos dinâmicos individuais.

3.3.2 Espalhamento de Luz Estático (SLS)

As medidas de espalhamento de luz estático foram realizadas na mesma região angular (de 30° até 150°). O raio de giração (R_G) dos poliPLEXOS produzidos foi obtido utilizando-se a equação exponencial de Guinier, que descreve a curva de Intensidade $\ln I(q)$ vs. q^2 .

$$\ln I(q) = \ln I_0 - \frac{R_G^2}{3} q^2 \quad (6)$$

Desta maneira, para sistemas monodispersos, o perfil de $\ln I_q$ vs. q^2 corresponde a uma reta onde o coeficiente angular é proporcional ao quadrado do raio de giração R_G (incl. = $R_G^2/3$). (OLIVEIRA NETO, 2008)

3.3.3 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)

Medidas de potencial zeta (espalhamento de luz eletroforético) foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Para tanto, 800 μ L de cada amostra foram inseridas em células de policarbonato dotadas de contatos metálicos banhados em ouro, específicas para este tipo de análise. A aplicação de um campo elétrico, ou equivalentemente de uma diferença de potencial, resulta em um movimento induzido das partículas dotadas de carga em uma solução. Dada a força de atrito dependente da

viscosidade do meio, as partículas irão adquirir uma velocidade constante a partir do repouso a depender do valor do campo elétrico presente. Da razão da distribuição destas velocidades finais pelo campo elétrico aplicado, denominada mobilidade eletroforética (U_E), obtém-se a distribuição do potencial Zeta da amostra utilizando-se a equação de Henry:

$$\zeta = \frac{3 \eta U_E}{2 \varepsilon f(ka)} \quad (7)$$

onde ε é a constante dielétrica do solvente e η a sua viscosidade. O parâmetro $f(ka)$ é a função de Henry calculada através da aproximação de Smoluchowski $f(ka) = 1.5$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Complexação de DNA

A capacidade de ligação entre os polímeros e DNA foi analisada qualitativamente via eletroforese em gel de agarose. A Figura 4 mostra os resultados obtidos para ambos os polímeros. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular de DNA, e a coluna 2 trata do controle negativo, onde apenas ctDNA está presente (N/P = 0,0). Para o PEI 1,2 kDa, as faixas correspondentes ao N/P 0,5 e 1,0 evidenciam que ainda existem cargas negativas provenientes dos grupos fosfatos presentes no DNA, sendo o polímero, nestas concentrações, incapaz de neutralizar completamente as cargas, permitindo o deslocamento das partículas através do gel. Para as demais faixas, os poliplexos permaneceram estáticos sob o campo elétrico, sugerindo partículas neutras ou positivas, dado o arranjo do experimento (polo positivo encontra-se na parte inferior da figura representada). Já para o PEI 25,0 kDa não foi observada mobilidade eletroforética para nenhuma razão N/P, mostrando que o polímero de maior massa molecular foi capaz de se ligar ao DNA, promovendo a neutralização dos ácidos nucleicos

mesmo em razões N/P menores, onde pouco polímero está presente, ou a formação de partículas positivamente carregadas.

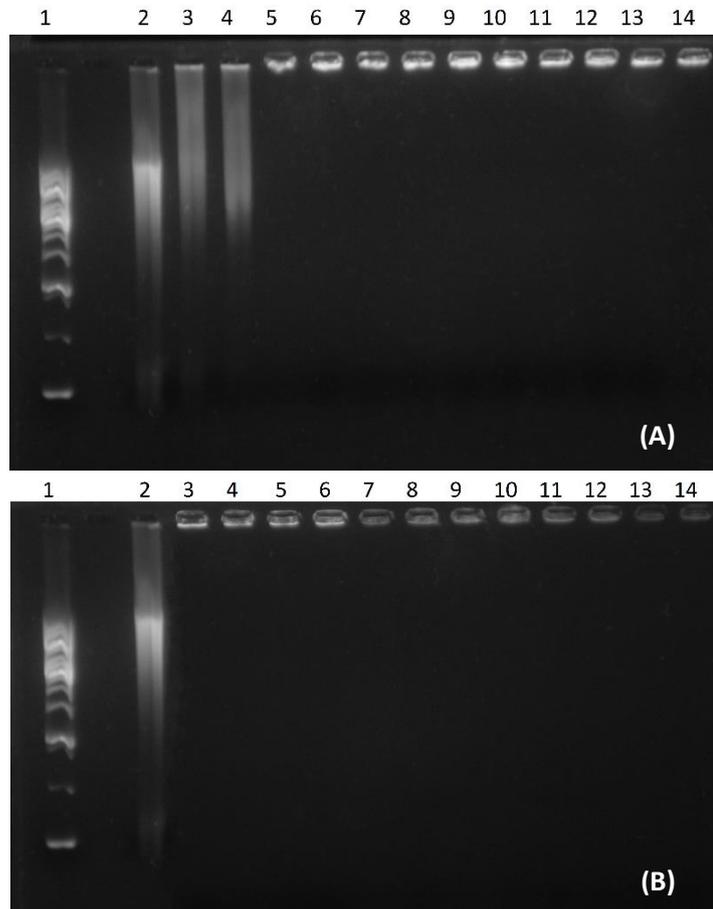


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25 kDa. A numeração indica, em ambos os casos: (1) marcador molecular (1 kb); (2) ctDNA; (3) N/P = 0,5; (4) N/P = 1,0; (5) N/P = 2,0; (6) N/P = 3,0; (7) N/P = 4,0; (8) N/P = 5,0; (9) N/P = 6,0; (10) N/P = 7,0; (11) N/P = 8,0; (12) N/P = 9,0; (13) N/P = 10,0; (14) N/P = 20,0. Utilizou-se gel de agarose 1% contendo GelRed™ em tampão TAE, a uma ddp de 100 V por 60 minutos.

4.2 Evolução Estrutural durante a Formação dos Políplexos

Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) permitiram avaliar a complexação de ctDNA para diferentes razões N/P. A Figura 5 mostra as funções de distribuição de tamanhos em função desta variável. É possível observar uma única população de partículas e um deslocamento para a esquerda à medida que mais polímero é adicionado, o que indica maior compactação da estrutura e redução progressiva de tamanho. Já a Figura 6 mostra os valores de R_H em função da razão N/P.

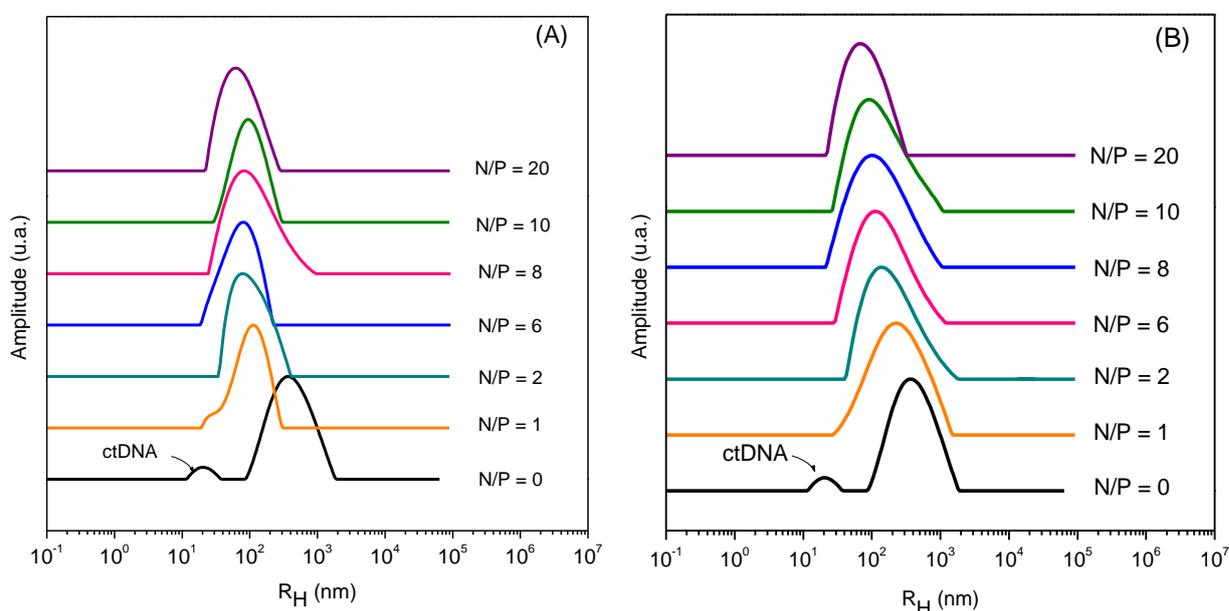


Figura 5. Distribuição de R_H como função da razão N/P para (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25 kDa.

Alguns pontos foram suprimidos no gráfico correspondente a 1,2 kDa apresentado na Figura 6. Isto se deve à obtenção de valores inconsistentes para R_H , estando em discordância com a tendência de redução de raio. Nestes pontos foi observada a formação de agregados muito grandes (acima de 400 nm), resultado da grande instabilidade dos sistemas. O comportamento de redução gradual de tamanhos conforme a adição de polímero ao sistema é esperada, e observada na grande maioria dos estudos realizados até o momento, tanto para PEI como para outros polímeros. O aumento de tamanho é observado quando ocorre agregação das partículas.

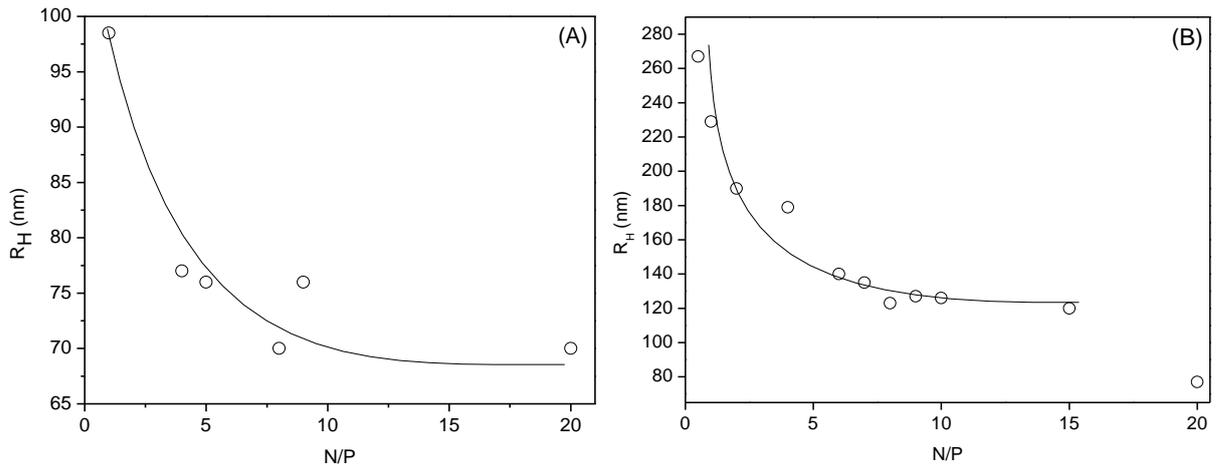


Figura 6. R_H em função da razão N/P para (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25 kDa.

As medidas de espalhamento de luz eletroforético (ELS) permitiram determinar o potencial- ζ para as diferentes razões N/P. Os resultados são mostrados na Figura 7. Inicialmente os valores de potencial- ζ são negativos, devido à presença de grupos fosfato livres. As adições sucessivas de polímero levam à condensação e neutralização do ctDNA, e posterior ocorrência de cargas positivas nas partículas, até atingir um valor assintótico de $\zeta \sim +30$ mV. Este valor de potencial- ζ próximo a +30 mV é condição para estabilização eletrostática de sistemas coloidais. Já a ocorrência de cargas muito positivas aumenta a citotoxicidade das partículas. Assim, observa-se que essa condição é atingida em N/P ~ 20 para ambos os polímeros estudados, estes sistemas foram mais detalhadamente caracterizados.

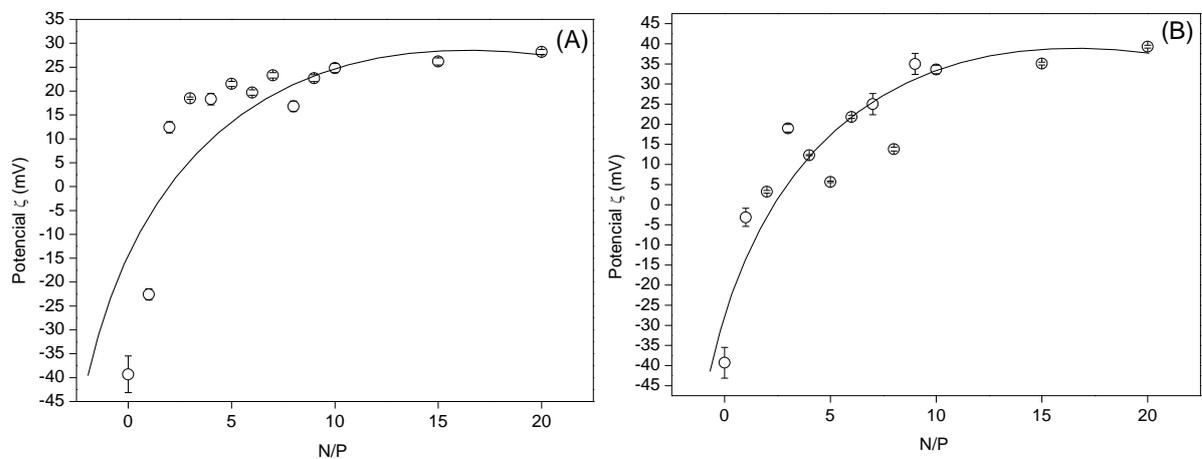


Figura 7. Valores de potencial- ζ obtidos para os poliplexos produzidos a partir de (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25 kDa.

4.3 Caracterização Detalhada dos Poliplexos Produzidos a N/P = 20

A caracterização detalhada dos sistemas a N/P = 20 foi complementada utilizando-se as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS). A frequência de relaxação Γ foi plotada como uma função do quadrado do módulo de vetor de espalhamento (q^2). Como mostrado na Figura 8, o gráfico de Γ vs. q^2 apresenta comportamento linear, o que é representativo de um modo difusivo. Ainda a partir do gráfico de Γ vs. q^2 pode-se calcular o valor médio do raio hidrodinâmico (R_H) levando-se em conta o coeficiente de difusão determinado pela inclinação da curva e a relação de Stokes-Einstein.

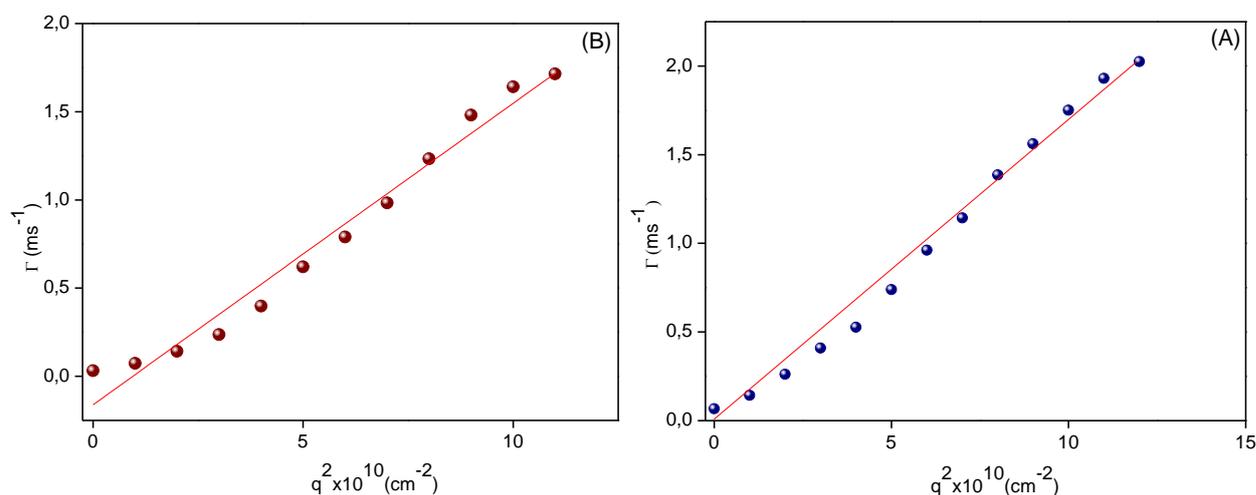


Figura 8. Γ vs. q^2 para PEI 1,2 kDa (A) e PEI 25 kDa (B) na condição N/P = 20.

Os raios hidrodinâmicos obtidos foram de 70,4 nm para PEI 1,2 kDa e 77,2 nm para PEI 25,0 kDa. O maior tamanho de R_H para PEI 25,0 kDa pode ser explicado pelo tamanho da cadeia polimérica utilizada, aproximadamente 25 vezes maior que a cadeia de PEI 1,2 kDa.

Os valores de raio de giração (R_G) foram estimados a partir do coeficiente angular dos perfis de $\ln 1/I(q)$ vs. q^2 , representado na Figura 9. Utilizando-se a aproximação de Guinier, o perfil de $\ln 1/I(q)$ vs. q^2 apresenta comportamento linear, sendo o coeficiente angular proporcional ao quadrado do raio de giração ($\alpha = R_G^2/3$).

Os valores de R_G obtidos foram de 64,5 nm (PEI 1,2 kDa) e 75,3 nm (PEI 25,0 kDa). A partir dos valores de R_H e R_G foi possível identificar a forma geométrica das partículas através da relação $\rho = R_G/R_H$, que é um parâmetro sensível à estrutura do objeto analisado e permite inferir informações sobre seu formato, estrutura interna e conformação. Diferentes formas se relacionam a valores específicos deste parâmetro.

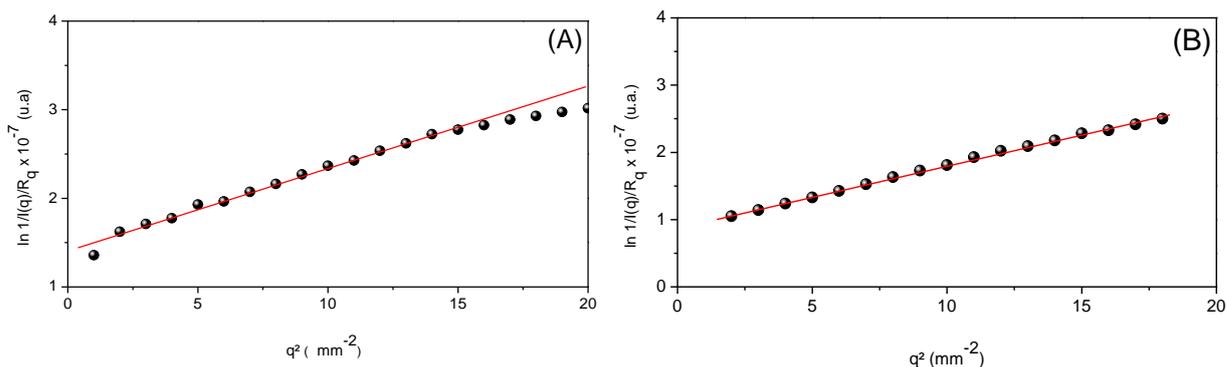


Figura 9. Comportamento de $\ln 1/I(q)$ vs. q^2 para (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25 kDa.

Esferas rígidas possuem um valor teórico igual a 0,775 ao passo que bastões apresentam $\rho \geq 2$. (SEDLÁK, 2009) Ainda, levando-se em consideração objetos esféricos, ρ pode variar dependendo do grau de compactação. Valores de $\sim 0,8-0,9$ correspondem a micelas hidratadas e valores mais altos do que $\sim 1,0$ relacionam-se a esferas e vesículas ocas. (BURCHARD, 2003) Os valores de ρ obtidos foram de 0,91 e 0,97 para PEI 1,2 kDa e PEI 25,0 kDa respectivamente. Assim, pode-se sugerir que as partículas produzidas são esféricas, entretanto de elevado grau de hidratação.

4.4 Conformação do DNA após a Compactação

As técnicas de espectroscopia UV-Vis e dicroísmo circular foram utilizadas para verificar possíveis mudanças conformacionais ou desnaturação das cadeias de DNA devido à condensação. Os efeitos da condensação devem ser estudados pois, além das interações eletrostáticas entre polímero e DNA, podem ocorrer mudanças conformacionais e formação de

ligações de hidrogênio durante a condensação, impactando a funcionalidade dos ácidos nucleicos. A Figura 10 mostra os sinais de dicroísmo circular para ctDNA e para os poliplexos produzidos a partir dos polímeros PEI 1,2 kDa e 25 kDa em N/P = 20.

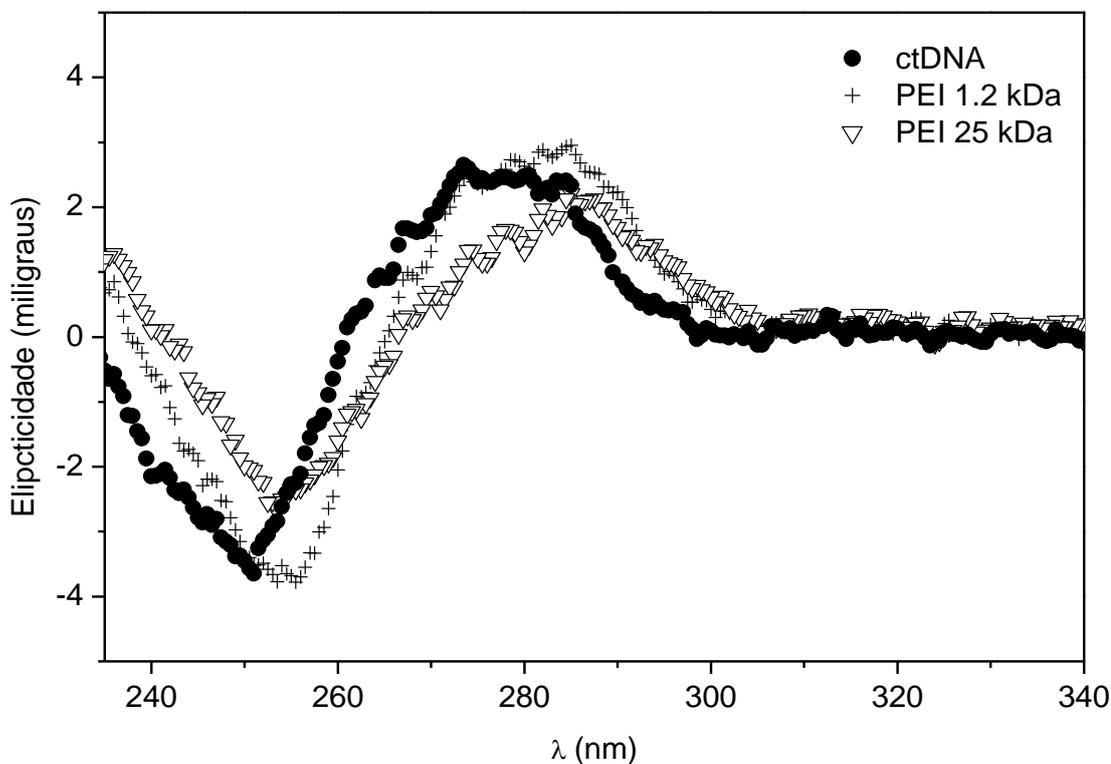


Figura 10. Espectro de CD para ctDNA puro (●) e poliplexos produzidos a partir de PEI 1,2 kDa (+) e PEI 25 kDa (▽) em N/P = 20. Espectro registrado no intervalo de 350 nm – 230 nm, com resolução de 0,5 nm, sendo realizadas 8 obtensões para redução do ruído associado, utilizando-se água como branco.

Como os polications não exibem banda de absorção na região avaliada para o ctDNA, os espectros obtidos se relacionam apenas à absorção das bases nucleotídicas. A forma do espectro obtido é característica de duas fitas na conformação B, exibindo um pico negativo em aproximadamente 248 nm e um pico positivo próximo a 274 nm, correspondendo a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ das bases nucleotídicas.(GRAY, 1992) Os espectros mostrados na Figura 10 mostram um desvio para o vermelho nos picos positivo e negativo para ambos

poliplexos, além de uma redução da intensidade dos picos para PEI 25,0 kDa, o que sugere mudança na estrutura do DNA devido à complexação. O desvio dos picos foi de aproximadamente 4 nm para o pico negativo, e 10 nm para o pico positivo. Estudos mostram que estas mudanças não podem ser atribuídas a mudança para as conformações A ou C do DNA.(CHOOSAKOONKRIANG *et al.*, 2003) Uma explicação pode estar baseada em perturbações estruturais causada pela interação entre PEI e as bases do DNA, possivelmente correspondendo ao enfraquecimento da interação $\pi \rightarrow \pi$, importantes para a organização das moléculas de DNA.(HAN *et al.*, 2004) Similarmente, a presença de ligações de hidrogênio alteraria o perfil da curva.(PREVETTE *et al.*, 2008) As propriedades espectrais dos poliplexos não estão necessariamente relacionadas à sua capacidade de transfecção, sendo mais relevante como indicativo das interações entre polímero e DNA (CHOOSAKOONKRIANG *et al.*, 2003). Choosakoonkring e colaboradores obtiveram resultados semelhantes para PEI 25, kDa, observando o desvio para o vermelho em razões N/P acima de 2. (CHOOSAKOONKRIANG *et al.*, 2003). Para PEI 1,2 kDa, Han e colaboradores também observaram desvios nos espectros de dicroísmo circular, em estudo comparativo dos efeitos de PEI com diferentes massas moleculares. (HAN *et al.*, 2004)

Na Figura 11 são exibidos os resultados para varredura por espectroscopia UV-Vis para ctDNA (N/P=0) e para os poliplexos formados em várias razões N/P. O máximo de absorção é mantido em 260 nm, com apenas um pequeno desvio para PEI 25,0 kDa em valores de N/P mais elevados.

Os resultados obtidos por espectroscopia UV-Vis e dicroísmo circular mostram algum grau de alteração na estrutura secundária das cadeias de DNA devido à presença dos polications. Ainda assim, o DNA parece estar essencialmente em sua conformação B, sugerindo que a interação PEI/DNA ocorre principalmente por interações eletrostáticas entre os grupos fosfato e amina, apesar de ocorrer certo distúrbio na conformação das cadeias de DNA.

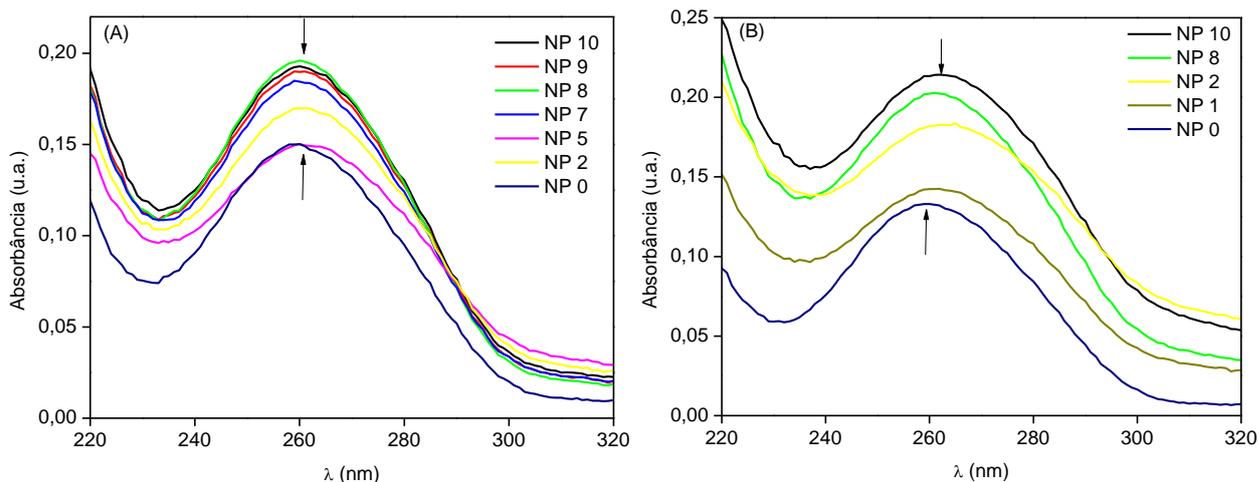


Figura 11. Espectro UV-Vis mostrando a absorção UV para ctDNA em função da razão N/P para (A) PEI 1,2 kDa e (B) PEI 25,0 kDa. Espectros registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, a temperatura ambiente, e corrigidos pela subtração de fundo referente ao solvente (água).

5. Conclusão

As análises realizadas por eletroforese em gel de agarose mostraram que o polímero PEI 25,0 kDa é melhor agente complexante em comparação com PEI 1,2 kDa em razões N/P 0,5 e 1,0. Os dados de DLS obtidos para N/P entre 0,8 e 20 demonstraram que ocorre a compactação das nanoestruturas formadas, caracterizadas pelo deslocamento para a esquerda das curvas de distribuição de tamanhos. O polímero de menor peso molecular produziu nanopartículas com raios consideravelmente menores em relação a PEI 25,0 kDa, sendo este um resultado esperado, pois o polímero de maior peso molecular tem tamanho aproximadamente 25 vezes maior, impactando no tamanho final da partícula. Ambos os polímeros produziram políplexos com raio aproximado de 70-80 nm para N/P =20. As medidas de ELS determinaram o aumento da carga das partículas em função de N/P. Os valores de potencial ζ se tornaram positivos a partir de N/P = 2,0 para ambos os polímeros, ocorrendo uma estabilização próximo a + 30 mV. Este valor de potencial ζ foi utilizado como parâmetro para o estudo mais aprofundado dos sistemas

produzidos em $N/P = 20$, uma vez que trata-se de condição para estabilização eletrostática de sistemas coloidais. O raio de giração e o coeficiente de forma obtidos a partir de SLS demonstraram que as partículas formadas têm formato esférico e são hidratadas. Estes dados também mostraram uma distribuição monomodal das partículas produzidas. A ocorrência de mudanças conformacionais foi evidenciada pelos espectros de dicroísmo circular, que apresentam desvio para o vermelho e alteração na intensidade dos picos. Isto pode ser explicado pelo enfraquecimento das interações $\pi \rightarrow \pi$, essenciais para a organização das moléculas de DNA. Por outro lado, os espectros UV-Vis não mostram grandes alterações no máximo de absorção, apresentando apenas um pequeno desvio para PEI 25,0 kDa. Sendo assim, pode-se dizer que as cadeias de DNA se encontram ainda na conformação B e que, essencialmente, a interação PEI/DNA ocorre por forças eletrostáticas.

O conjunto de dados obtidos permite concluir que ambos os polímeros são adequados para formação de poliplexos com potencial uso em terapia genética, pois apresentam características físico-químicas adequadas para este fim, como tamanho da partícula, carga superficial e capacidade de condensação de DNA sem perdas conformacionais severas. As técnicas utilizadas para produção e caracterização dos poliplexos também se mostraram adequadas, gerando resultados consistentes com os encontrados na literatura.

6. Referências Bibliográficas

ALATORRE-MEDA, M. *et al.* DNA-Poly(diallyldimethylammonium chloride) complexation and transfection efficiency. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 29, p. 9356–9366, 2010.

BEHR, J.-P. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *Chimia*, v. 51, p. 34 – 36, 1997.

BURCHARD, W. Solubility and Solution Structure of Cellulose Derivatives. *Cellulose*, v. 10, n. 3, p. 213–225, 2003.

CHOOSAKOONKRIANG, S. *et al.* Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 8, p. 1710–1722, 2003.

GRAY, D. M.; RATLIFF, R. L.; VAUGHAN, M. R. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA. *Methods in Enzymology*, v. 211, n. 1980, p. 389 – 406, 1992.

HAN, J. *et al.* Effect of molecular weights of polyethyleneimine on the polyplex formation with calf thymus DNA. *Macromolecular Research*, v. 12, n. 3, p. 276–281, 2004.

HAN, J. *et al.* Polyplex formation of calf thymus DNA with branched and linear polyethyleneimine. *Macromolecular Research*, v. 12, n. 5, p. 501–506, 2004.

KUNATH, K. *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: Comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *Journal of Controlled Release*, v. 89, n. 1, p. 113–125, 2003.

LÄCHELT, U.; WAGNER, E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chemical Reviews*, v. 115, n. 19, p. 11043–11078, 2015.

LUO, D.; SALTZMAN, W. M. Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 33–37, 2000.

OLIVEIRA NETO, M. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas. p. 153, 2008.

PARK, T.; JEONG, J.; KIM, S. Current status of polymeric gene delivery systems☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 4, p. 467–486, 2006.

PREVETTE, L. E. *et al.* Correlation of Amine Number and pDNA Binding Mechanism for Trehalose-Based Polycations. *Langmuir*, v. 24, n. 15, p. 8090 – 8101, 2008.

ROLLAND, A. Gene medicines: The end of the beginning? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 5, p. 669–673, 2005.

SEDLÁK, M.; KOŇÁK, C. A New Approach to Polymer Self- Assembly into Stable Nanoparticles: Poly(ethylacrylic Acid) Homo- polymers. *Macromolecules*, v. 42, n. 19, p. 7430–7438, 2009.

VARKOUHI, A. K. *et al.* Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, v. 151, n. 3, p. 220–228, 2011.