

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARIANI MACHADO VASCONCELLOS**

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA ELETROFORÉTICA PARA AVALIAÇÃO DA  
COMPLEXAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A NANOEMULSÕES CATIÔNICAS**

**Uruguaiana – RS**

**2018**

**Mariani Machado Vasconcellos**

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA ELETROFORÉTICA PARA  
AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS À NANOEMULSÕES  
CATIÔNICAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao curso de Farmácia  
da Universidade Federal do Pampa  
(UNIPAMPA), como requisito parcial  
para aprovação na disciplina de  
Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleci  
Menezes Moreira

Área de concentração: Farmácia

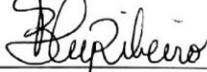
Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 03/07/2018

Banca examinadora:



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleci Menezes Moreira  
Orientadora  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Bley Ribeiro  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Eduardo André Bender  
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais Antonio e Rozelaine, aos meus irmãos Heloiza e Adelino, aos meus sobrinhos Danilo e Livia, a Nadiele, aos meus cunhados Carine e Marcos e a minha avó Maria que foram meus maiores incentivadores, por todo apoio e compreensão durante o período da graduação.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a orientação e ensinamentos da professora Cleci e Fernanda, não somente durante este trabalho, mas em boa parte da minha vida acadêmica, sinto-me muito feliz em ter trabalhado com duas pessoas brilhantes.

A professora Vanessa Bley e ao professor Eduardo Bender por aceitarem fazer parte da minha banca, ambos sabem que tenho grande admiração e carinho.

A todos colegas e amigos da turma XV de farmácia, Maria Julia, Jean, Sonia e Karine, pela amizade durante esses anos e em especial para minha amiga Renata pelo companheirismo e por estar comigo em todas as horas, já passamos por cada uma juntas nas madrugadas de lab e nas idas e vindas de Itaqui, tu sabes do carinho imenso que tenho por ti.

A todos os colegas do lab 105 e da bioquímica, em especial ao Gabriel, Luiz, Riciele, Cristine, Taiane, Sue e Fabrício.

Ao Gabriel Gollino do laboratório de Microbiologia Clínica, por todo apoio, ensinamento e paciência comigo, tenho muito a te agradecer.

Agradeço também a todos os meus amigos dos outros laboratórios em especial ao GBToxCe pela amizade e troca de experiências.

As farmacêuticas Raqueli e Mariana por terem me ensinado muito durante os estágios, vocês foram muito importantes para a minha formação, tenho grande admiração por vocês.

Agradeço a Nadiele por todo carinho, paciência, incentivo para que eu continuasse e por ter aguentado dias e noites de estudo ao meu lado. Muito obrigada por tudo.

Aos meus pais Antonio e Rozelaine, por terem me apoiado e terem me dado todo o incentivo e apoio durante os meus estudos e a minha vida toda, amo vocês infinitamente. A minha irmã Heloiza por ter escutado minhas lamentações e alegrias desde o início, meu irmão Adelino pela amizade e carinho mesmo de longe, aos meus sobrinhos Danilo e Lívia por recarregarem as minhas energias (são meus amores) e meus cunhados Marcos e Carine que também foram grandes apoiadores desde o início.

“O seu lugar é aquele onde você deseja  
estar”

Autor - Lázaro Ramos -

## RESUMO

A terapia gênica constitui uma alternativa promissora para o tratamento de doenças. Dentre os ácidos nucléicos utilizados, estão: os oligonucleotídeos (ON) e os plasmídeos. No entanto, esses sistemas tem baixo potencial de transfecção, exigindo assim, veículos para melhorar a absorção celular, dentre os quais destacam-se as nanoemulsões catiônicas. Surge assim a necessidade de avaliar o grau de complexação dos ácidos nucléicos a estes carreadores, já que apenas metodologias qualitativas, indiretas e não padronizadas têm sido utilizadas. Desta forma, o trabalho visa padronizar uma técnica capaz de avaliar o grau de complexação das formulações com dois ácidos nucléicos modelos (oligonucleotídeo e plasmídeo), em diferentes relações de carga. As nanoemulsões foram preparadas através da técnica de emulsificação espontânea e caracterizadas quanto a distribuição do tamanho de gotícula e potencial zeta. Foram preparados os complexos com os ácidos nucléicos por adição extemporânea, nas relações de carga teóricas de [+4/-]; [+2/-]; [+0,4/-] e [+0,2/-]. Foi utilizada a técnica de retardamento em gel de eletroforese para avaliar a formação dos complexos com o plasmídeo (agarose 1%) e oligonucleotídeo (agarose 2%). Primeiro, testou-se a quantidade de SYBR Gold® e amostra a serem adicionadas no ponto de aplicação. Foram então elaboradas curvas-padrão tanto para o plasmídeo quanto para o oligonucleotídeo. As formulações apresentaram-se na faixa nanométrica, com polidispersão inferior a 2 e potencial zeta positivo. Definiu-se que a concentração de agarose para o plasmídeo seria 1% e para o oligonucleotídeo 2%. A quantidade de amostra adicionada no ponto de aplicação foi 5µL para 5 µL de SYBR Gold®. Para a avaliação da complexação, a técnica eletroforética padronizada demonstrou o aparecimento de bandas nas relações de carga inferiores [+0,4/-] e [+0,2/-], para ambos os ácidos nucléicos, demonstrando que quando ocorre a diminuição de sítios positivos, não acontece a interação eletrostática e o ácido nucléico livre consegue migrar no gel. Ambos os complexos não apresentaram banda nas relações de carga [+4/-] e [+2/-], podendo-se inferir que tenha ocorrido a complexação nestas situações. Além disso, apesar dos ácidos nucléicos testados apresentarem tamanhos distintos, o limite de complexação em relação de cargas mostrou-se o mesmo através da técnica padronizada.

Palavras-chave: oligonucleotídeo, plasmídeo; eletroforese, complexos

## ABSTRACT

Gene therapy is a promising alternative for the treatment of diseases. Among the nucleic acids used are: oligonucleotides (ON) and plasmids (pDNA). However, these systems have low potential for transfection, thus requiring vehicles to improve cellular uptake, among which the cationic nanoemulsions stand out. This raises the need to evaluate the degree of nucleation of nucleic acids to these carriers, since only qualitative, indirect and non-standard methodologies have been used. In this way, the work aims to standardize a technique capable of evaluating the degree of complexation of the formulations with two nucleic acid models (oligonucleotide and plasmid), in different charge relationships. The nanoemulsions were prepared by the spontaneous emulsification technique and characterized as droplet size distribution and zeta potential. The complexes with the nucleic acids were prepared by extemporaneous addition, at the theoretical loading ratios of [+4/-]; [+2/-]; [+0.4/-] and [+0.2/-]. The electrophoresis gel retardation technique was used to evaluate the formation of the complexes with the plasmid (1% agarose) and oligonucleotide (2% agarose). First, the amount of SYBR Gold® and sample to be added at the point of application was tested. Standard curves were then made for both the plasmid and the oligonucleotide. The formulations presented mean droplet size in the nanometric range, with Span values lower than 2 and positive zeta potential. It was defined that the concentration of agarose for the plasmid would be 1% and for the 2% oligonucleotide. The amount of sample added at the point of application was 5 µL for 5 µL of SYBR Gold®. For the evaluation of the complexation, the standardized electrophoretic technique demonstrated the appearance of bands at the lower charge ratios [+ 0,4 / -] and [+ 0,2 / -], for both nucleic acids, demonstrating that when a decrease of positive sites occurs, the electrostatic interaction is reduced and free nucleic acids are able to migrate in the gel. Any of the complexes presented a band in the load relationships [+4/-] and [+2/-], and it may be inferred that complexation occurred in these situations. In addition, although the nucleic acids had different sizes, the charge ratio limit of complexation was the same by the standardized technique.

Key-words: oligonucleotides; plasmids; electrophoresis; complexes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema das alternativas mais seguras em relação ao Brometo de etídio. .....	20
<b>Figura 2</b> - Distribuição dos tamanhos de gotículas das nanoemulsões. ....	28
<b>Figura 4</b> - Avaliação preliminar da concentração de agarose. ....	31
<b>Figura 5</b> - Avaliação da proporção SYBR Gold e amostra para visualização dos oligonucleotídeos. ....	32
<b>Figura 7</b> - Curva-padrão das soluções de oligonucleotídeos livres. ....	34
<b>Figura 9</b> - Representação da avaliação da complexação do pDNA com as nanoemulsões.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Condições eletroforéticas para análises de ácidos nucléicos.....	22
<b>Tabela 2</b> - Composição das nanoemulsões. ....	24
<b>Tabela 3</b> - Caracterização físico-química das nanoemulsões (n=3).....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DOTAP – 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano

NE – Nanoemulsão sem polissorbato 80

NEP – Nanoemulsão com polissorbato 80

NE/ON - Nanoemulsão sem polissorbato 80 complexada com oligonucleotídeo

NE/pDNA – Nanoemulsão sem polissorbato 80 complexada com pDNA

NEP/ON – Nanoemulsão com polissorbato 80 complexada com oligonucleotídeo

NEP/pDNA – Nanoemulsão com polissorbato 80 complexada com pDNA

ON – Oligonucleotídeo

pDNA – Plasmídeo de DNA

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

P80 – Polissorbato 80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
<b>4</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
4.1.	<i>Terapia gênica</i>	16
4.2.	<i>Ácidos nucleicos</i>	16
4.3.	<i>Desafios terapêuticos</i>	17
4.4.	<i>Nanocarreadores</i>	17
4.5.	<i>Determinação da complexação</i>	18
4.6.	<i>Eletroforese</i>	19
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
5.1.	<i>Materiais</i>	23
5.2.	<i>Ácidos Nucleicos</i>	23
5.3.	<i>Preparo das nanoemulsões</i>	23
5.4.	<i>Caracterização físico-química</i>	24
5.5.	<i>Complexação com os ácidos nucleicos</i>	24
5.6.	<i>Padronização da técnica de retardamento em gel de eletroforese</i>	25
5.7.	<i>Análise estatística</i>	26
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
6.1.	<i>Caracterização físico-química</i>	27
6.2.	<i>Padronização dos parâmetros eletroforéticos</i>	30
6.4.	<i>Elaboração da curva-padrão das soluções de plasmídeos livres</i>	33
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>39</b>
7.1.	<i>Perspectivas</i>	39
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sequenciamento do genoma e a elucidação de vias moleculares importantes em doenças, sustentou o surgimento de novas alternativas terapêuticas como, por exemplo, a terapia gênica (OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002; BAKAR *et al.*, 2017).

Estudos relativos ao emprego da terapia gênica têm sido descritos como promissores para o tratamento de uma série de doenças tanto adquiridas como hereditárias (COTRIM e BAUM, 2008; FRAGA *et al.*, 2017). Basicamente, pode-se resumir a terapia gênica a um conceito, onde o problema pode ser solucionado pela transferência de material genético para células específicas e com isso aumentar ou limitar processos anteriores a produção de uma proteína-alvo (KAWAKAMI *et al.*, 2008).

Neste viés, a literatura, exaustivamente, tem avaliado o uso de fragmentos de DNA em fita simples, também chamados de oligonucleotídeos antisense, que apresentam de 12 a 40 nucleotídeos organizados em uma sequência estabelecida para interagir com um determinado gene, RNA mensageiro ou proteína (MCCLOREY e WOOD, 2015). O material genético também pode ser encontrado na forma plasmidial, onde o gene de interesse é inserido em um plasmídeo, que são moléculas de DNA circulares e extracromossômicas (LECHARDEUR *et al.*, 2005).

No entanto, ácidos nucleicos livres não são espontaneamente ocupados pelas células, pois apresentam elevado peso molecular e caráter polianiônico, o que dificulta sua aproximação da membrana celular. Além disso, caso ocorra, a penetração na célula e a mobilidade ficam restritas devido à presença de obstáculos citoplasmáticos, ligação com proteínas e degradação por nucleases. Neste viés, o sucesso da terapia gênica depende do desenvolvimento de um sistema de entrega eficiente e seguro (KAWAKAMI *et al.*, 2008; FRAGA *et al.*, 2017; NAM *et al.*, 2009).

Para contornar esses problemas, uma variedade de sistemas carreadores tem sido desenvolvidos, dentre eles, destaca-se o uso de nanoemulsões catiônicas (TEIXEIRA *et al.*, 1999; HAGIGIT *et al.*, 2010; SCHUH *et al.*, 2018). É importante salientar que estes sistemas são compostos por um núcleo oleoso que, teoricamente, mantém-se estável por uma mistura de fosfolipídeos e lipídeos catiônicos (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Estes sistemas formam um complexo eletrostático entre os lipídeos catiônicos e as cargas residuais do material genético (LV *et al.*, 2006; MARTINI *et al.*,

2008; VERISSIMO *et al.*, 2010), o que conduz a uma redução de sua degradação pelas nucleases (BIVAS-BENITA *et al.*, 2004).

Neste contexto, estudos salientam diversas metodologias capazes de avaliar o grau de associação dos ácidos nucleicos com as nanoemulsões catiônicas, como por exemplo, alterações no potencial zeta ou diâmetro de gotícula, técnicas microscópicas, técnicas de ultrafiltração ou ultracentrifugação, ou técnicas de retardamento em gel de eletroforese (YI *et al.*, 2000; BARUT *et al.*, 2005; BRUXEL *et al.*, 2011). Entretanto, a maioria emprega técnicas qualitativas indiretas, aplicando metodologias vagas e não padronizadas. Os métodos eletroquímicos, destacando-se a eletroforese, têm alta capacidade de resolução, são mais simples, eficientes e menos onerosos em comparação com a cromatografia de alta eficiência, por exemplo. A técnica eletroforética envolve a aplicação de um campo elétrico que faz com que o ácido nucléico migre com base no seu tamanho, carga e conformação estrutural (SLATER e GUO, 1996).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os limitantes da técnica de retardamento em gel de eletroforese, são: a dificuldade de detecção, assim como a necessidade da utilização de corantes mais seguros, e a definição de um limite de detecção para os ácidos nucléicos testados. Considerando as dificuldades observadas na técnica para avaliação da complexação de ácidos nucléicos o presente trabalho justifica-se pela relevância de otimizá-la para escolha de um carreador que consiga contornar barreiras fisiológicas e desta forma proteger os genes terapêuticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Padronizar as condições para determinação qualitativa da complexação de ácidos nucléicos modelos (oligonucleotídeo e plasmídeo) a nanoemulsões catiônicas por retardamento em gel de eletroforese.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Preparar nanoemulsões catiônicas por emulsificação espontânea, na presença e ausência de polissorbato 80.
- ✓ Padronizar os parâmetros eletroforéticos (concentração do gel, quantidade de amostra, condições de corrida).
- ✓ Definir o limite de detecção da técnica para oligonucleotídeo e plasmídeo modelos.
- ✓ Avaliar a complexação qualitativa das formulações com os ácidos nucléicos modelos.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1. Terapia gênica

A busca por novas ferramentas para o tratamento de doenças é um desafio constante no campo farmacêutico, dentre as quais, a terapia gênica constitui uma das mais promissoras (TEIXEIRA *et al.*, 2017). A terapia sugerida é baseada na transferência de um material genético exógeno para a célula que tem por objetivo substituir genes defeituosos, inibir a expressão do gene patogênico ou ainda dar novas funções para a célula (JAGANI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016). Segundo Schuh e colaboradores (2016) o sucesso da terapia gênica depende de um sistema carreador que seja capaz de proteger o material genético e transportá-lo efetivamente para seu local de ação.

### 4.2. Ácidos nucleicos

Dentre os ácidos nucleicos que são utilizados na terapia gênica destacam-se: os oligonucleotídeos (ON) e o DNA plasmidial (pDNA). Os oligonucleotídeos podem ser do tipo antisense que são fitas simples de DNA, têm até 40 bases e são complementares ao RNA mensageiro. A sua ligação a este RNA mensageiro faz com que o processo de tradução seja restringido através de pontes de hidrogênio de Watson e Crick e assim reduz a síntese da proteína codificada. Estes têm sido relatados, como responsáveis por modular seletivamente a expressão de genes (FATTAL e BARRATT, 2009). Já o DNA plasmidial é utilizado como vetor para transporte de genes, mostrando-se seguro, gerando baixa resposta imune, facilidade de produção (WASUNGU *et al.*, 2006; DE LAPORTE *et al.*, 2006; MAIRHOFER e GRABHERR, 2008). No entanto, este sistema é geralmente ineficiente, ou seja, baixo potencial de transfecção na entrega de suas cargas, exigindo assim veículos ou modificações para melhorar a absorção celular (MAIRHOFER e GRABHERR, 2008).

#### 4.3. Desafios terapêuticos

Um dos problemas relacionados a entrega de genes terapêuticos é que os ácidos nucleicos em geral apresentam elevado peso molecular e caráter polianiónico, dificultando assim sua penetração celular através das membranas. Além disso, um dos desafios a entrega sistêmica é a degradação potencial do gene terapêutico por endonucleases no fluido fisiológico e no meio extracelular (TEIXEIRA *et al.*, 2001; YIN *et al.*, 2014; TATHEISHI-KARIMATA e SUGIMOTO, 2014). Devido aos fatores citados acima têm-se como resultado à má absorção celular. Para resolver este problema, sistemas de liberação de genes são utilizados e, geralmente, divididos em duas categorias: sistemas virais e não virais.

Os vetores virais representam os sistemas de liberação de cerca de 70% dos ensaios clínicos de terapia gênica realizados (YIN *et al.*, 2014). Embora esses sistemas tenham sido desenvolvidos devido a sua capacidade natural de infectar células, o grande problema está na geração de efeitos secundários graves relacionados com a sua segurança, bem como as respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro, limitando seu uso em aplicações clínicas (ZHI *et al.*, 2013; HARDEE, 2017). Alguns exemplos de vetores virais são: lentivírus, retrovírus e adenovírus (THOMAS e EHRHARDT 2003; WOLD e TOTH, 2013).

Neste sentido, o uso de vetores não virais representa um maior potencial para fornecer maiores cargas genéticas e são tipicamente mais fáceis de sintetizar e com menores efeitos indesejados do que os vetores virais (MINTZER *et al.*, 2009). Dentre eles, destacam-se os nanocarreadores que tem facilidade de entregar fármacos em sistemas vivos por contornar barreiras fisiológicas (SOKOLOVA e EPPLE, 2008).

#### 4.4. Nanocarreadores

O uso de nanocarreadores têm sido amplamente abordado na literatura (VERISSIMO *et al.*, 2010; SCHUH *et al.*, 2016). Novos sistemas nanocarreadores estão sendo pesquisados e avaliados para uma administração eficaz de ácidos nucleicos (KHACHANE *et al.*, 2014). Neste contexto, destacam-se as nanoemulsões catiônicas como consideradas potenciais sistemas de liberação para esses tipos de

moléculas (BRUXEL *et al.*, 2014). Esses sistemas devem ter em sua composição um núcleo oleoso estabilizado por um sistema tensoativo em uma fase aquosa, além da presença de um lipídeo catiônico. Os ácidos nucleicos (negativamente carregados) interagem de forma espontânea com a nanoemulsão, formando um par eletrostático com o lipídeo carregado positivamente, tais interações podem desempenhar um papel crucial na associação e na cinética de liberação (TEIXEIRA *et al.*, 2001; SINGH, *et al.*, 2017).

Alguns pesquisadores demonstraram a influência da composição dos fosfolipídeos e lipídeos catiônicos nas propriedades físico-químicas e na complexação de plasmídeos e oligonucleotídeos à nanoemulsões, sendo estes sistemas capazes de proteger os ácidos nucléicos da degradação por DNAses (FRAGA *et al.*, 2011; HAGIGIT *et al.*, 2008; BRUXEL *et al.*, 2014). Sendo assim, sistemas não-virais onde o oligonucleotídeo ou o DNA plasmidial está complexado a uma nanoemulsão catiônica proporcionam uma rota alternativa para entrega de genes (BARUT *et al.*, 2005). Mais adiante, para ser terapeuticamente útil, esse sistema de entrega deve possuir um tamanho pequeno para permitir a internalização em células e deve ser capaz de escapar do processamento endolisossomal (JAYAKUMAR *et al.*, 2010).

#### 4.5. Determinação da complexação

Diversas metodologias têm sido empregadas na tentativa de elucidar o mecanismo e a capacidade de associação dos ácidos nucléicos às nanoemulsões catiônicas, como técnicas de caracterização da carga de superfície, técnicas microscópicas, técnicas de ultrafiltração, ultracentrifugação e técnicas eletroforéticas (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Alternativamente, os métodos eletroquímicos têm alta capacidade de resolução, são mais simples, eficientes e menos onerosos em comparação com a cromatografia de alta eficiência, por exemplo (TAJIK *et al.*, 2014).

Dentre os ensaios eletroquímicos, o ensaio de retardamento em gel de eletroforese, caracteriza-se como uma técnica que permite avaliar de forma semi-quantitativa a complexação com nanoestruturas, sendo que as técnicas de caracterização da complexação, geralmente, são qualitativas. O gel de agarose é um polímero natural que forma uma malha através da qual o DNA, caso esteja livre, pode migrar. O complexo que não apresentar nenhuma banda característica de migração

de ácido nucleico livre indica a associação de 100% com a nanoestrutura (HUNG *et al.*, 2005; FRAGA *et al.*, 2011). Em relação à técnica de retardamento em gel de eletroforese, alguns autores avaliaram a complexação de oligonucleotídeos antisense à nanoemulsões catiônicas e o perfil de liberação das mesmas utilizando gel de poliacrilamida (HAGGIT *et al.*, 2008). A literatura preconiza para avaliar a associação de plasmídeos à nanoemulsões a utilização gel de agarose a 0,8% e visualização através de transiluminador UV (BARUT *et al.*, 2005).

#### 4.6. Eletroforese

O uso da eletroforese para quantificação de ácidos nucléicos começou no início dos anos 1960 (STELLWAGEN, 2009).

A técnica eletroforética envolve a aplicação de um campo elétrico que faz com que o ácido nucléico migre com base no seu tamanho, carga e conformação estrutural. Cada um dos nucleotídeos de um ácido nucléico tem uma carga negativa pela presença dos grupos fosfatos que são carregados negativamente em pH neutro a básico, com isso a carga de cada molécula de ácido nucleico é proporcional ao número de nucleotídeos ou à sua massa, ou seja, sua mobilidade pode ser atribuída, principalmente, ao seu tamanho (SLATER e GUO, 1996).

Em relação aos géis usados como matriz, a agarose e a poliacrilamida são as mais utilizadas na separação eletroforética de ácidos nucléicos, ambos não apresentam reatividade com as amostras e a porosidade pode ser ajustada variando a porcentagem da matriz. A escolha entre agarose e poliacrilamida depende, principalmente, da faixa de tamanho do material. A agarose forma uma rede capaz de separar moléculas de ácido nucléico na faixa de 0,1 a 25 kb, por outro lado, a poliacrilamida forma poros menores capazes de separar moléculas de ácido nucléico menores que 1 kb (LEE e BAHAMAN, 2012).

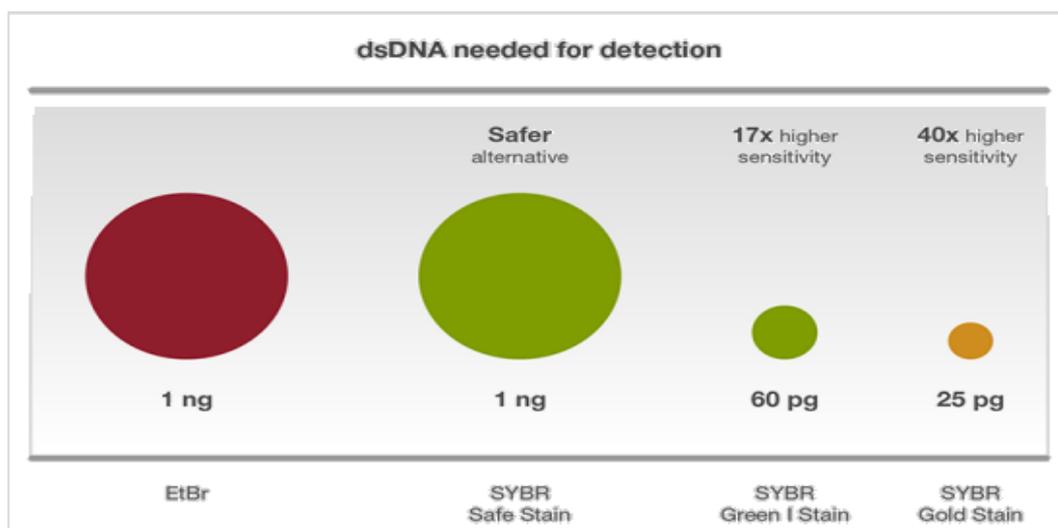
Para a separação eletroforética as amostras são submetidas a um campo elétrico, onde vão do ânodo (polo negativo) para o cátodo (polo positivo), sendo assim os parâmetros elétricos governam a eletroforese, como voltagem, corrente e potência (STELLWAGEN, 2009).

A obtenção de uma boa condutividade depende também da escolha do tampão. O TAE (Tris-acetato com EDTA) é eficiente para fragmentos maiores que 1500 pb,

estes tendem a proporcionar menos arraste com esse tampão, em contrapartida o TBE funciona melhor para fragmentos mais curtos e tem maior capacidade de tamponamento. Os géis são preparados com o tampão de corrida, neste caso, TBE (Tris-borato com EDTA) para manter o pH, a força iônica e garantir que a mobilidade eletroforética não seja afetada. Durante a eletroforese, o ambiente onde está o eletrodo negativo torna-se mais básico e o positivo mais ácido por causa do fluxo de elétrons resultando em eletrólise da água, logo um sinal revelador que o gel está funcionando é desprender bolhas de gás hidrogênio e oxigênio dos eletrodos. Por este motivo, o tampão de corrida e o tampão de preparação do gel devem ser os mesmos para garantir uma condutividade eficiente (BRODY, 2004).

Para a visualização dos ácidos nucleicos é necessário um método de detecção, pois os mesmos não são visíveis a olho nu, os corantes disponíveis oferecem diferentes faixas de sensibilidade na detecção das amostras. Os corantes mais utilizados são os fluorescentes devido a sua facilidade de uso e alta sensibilidade. A intensidade da fluorescência está correlacionada com a quantidade de ácido nucleico ligado (ThermoFisher, 2015).

**Figura 1** - Esquema das alternativas mais seguras em relação ao Brometo de etídio.



Legenda. Alternativas mais seguras para o uso de Brometo de etídio com seus níveis de sensibilidade. Fonte: Adaptado ThermoFisher, 2015.

Para realização da padronização, primeiramente, realizou-se uma pesquisa na literatura a fim de verificar o histórico da técnica desde concentrações dos géis,

condições eletroforéticas, marcadores, entre outros. A tabela 1 descreve alguns estudos a respeito da complexação de ácidos nucléicos com nanoestruturas

**Tabela 1** - Condições eletroforéticas para análises de ácidos nucleicos.

<b>Autores</b>	<b>Tipo de ácido nucleico</b>	<b>Carreador</b>	<b>Gel e Concentração</b>	<b>Condições eletroforéticas</b>	<b>Marcador</b>
YI <i>et al.</i> , 2000	Plasmídeo	Nanoemulsão catiônica	Agarose – 1% (m/v)	5 V/cm – em tampão TAE	Brometo de etídio 0,5 µg/mL
BARUT <i>et al.</i> , 2005	Plasmídeo	Nanoemulsão catiônica	Agarose – 0,8% (m/v)	70V por 2h – em tampão TBE	Brometo de etídio 0,5 µg/mL
FRAGA <i>et al.</i> , 2007	Plasmídeo	Nanoemulsão catiônica	Agarose – 1% (m/v)	50 V – em tampão TBE	Brometo de etídio 0,5 µg/mL
HAGIGIT <i>et al.</i> , 2008	Oligonucleotídeo	Nanoemulsão catiônica	Poliacrilamida	150 V, 500 mA, 75 min– em tampão TBE	Kit (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
SCHUH <i>et al.</i> , 2018	Plasmídeo doador de oligonucleotídeo	Nanoemulsão catiônica	Agarose - 1% (m/v)	Tampão TBE	SYBR Gold

TBE – Tampão Tris-borato - EDTA; TAE – Tampão Tris-acetato; ON – oligonucleotídeo. *Fonte: Yi et al., 2000; Barut et al., 2005; Fraga et al., 2007; Hagigit et al., 2008; Schuh et al., 2018.*

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. *Materiais*

Triglicerídeos de cadeia média (cáprico/caprílico), lecitina de gema de ovo e 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP) foram obtidos de Lipoid AG (Alemanha); Glicerol e Tween 80® (polissorbato 80) de Merck, (Alemanha), SYBR® Gold Nucleic Acid Stain de Invitrogen (EUA), Agarose Low Melting de Kasvi (EUA) e Padrão de Peso Molecular de Invitrogen (EUA).

### 5.2. *Ácidos Nucléicos*

Neste trabalho foram utilizados ácidos nucléicos modelos. O plasmídeo (pDNA) foi fornecido pelo Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o qual expressa o gene da enzima alfa-L-iduronidase. O mesmo foi cultivado em *Escherichia coli* mutada DH5 $\alpha$ -T1R (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e isolado usando uma coluna Maxi Prep High Purity (Invitrogen, EUA) de acordo com instruções do fabricante. O oligonucleotídeo antisense (ON), composto pela sequência 5' ATG TAA TAT TCT TTT GAA CCA TAC GAT TCT 3' (Invitrogen) foi adquirido comercialmente e fornecido pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 5.3. *Preparo das nanoemulsões*

As nanoemulsões brancas foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, conforme previamente descrito na literatura de acordo com Teixeira e colaboradores (2002). O mesmo consiste em solubilizar os constituintes da fase oleosa em solvente orgânico e a fase aquosa em água. Em seguida a fase orgânica é vertida sob a aquosa através de um funil calibrado, sob agitação constante, logo após é feita a evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador (TEIXEIRA *et al.*, 2017). A composição das nanoemulsões está descrita na Tabela 2.

**Tabela 2 - Composição das nanoemulsões.**

<b>Componentes (m/m)</b>	<b>NE (%)</b>	<b>NEP (%)</b>
TCM	8,00	8,00
Lecitina de gema de ovo	2,00	2,00
DOTAP	0,14	0,14
Polissorbato 80	-	1,00
Glicerol	2,25	2,25
Água Milli-Q® (mL)	q.s.p. 100,00	q.s.p. 100,00

Legenda: NEP - Nanoemulsão com Polissorbato 80; NE - Nanoemulsão sem Polissorbato 80; DOTAP - 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano; TCM – Triglicérides de cadeia média.

#### 5.4. Caracterização físico-química

As formulações foram caracterizadas logo após o preparo (T0) quanto ao diâmetro médio de gotícula [D(4,3)] e distribuição do tamanho das gotículas por difração de laser no equipamento Mastersizer® (Malvern), após diluição prévia das amostras até atingir a obscuridade exigida pelo equipamento. O potencial Zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas utilizando o equipamento Zetasizer® (Malvern), após diluição prévia das amostras em NaCl 1 mM. As formulações foram ainda caracterizadas após 30 dias de armazenamento entre 4 e 8 °C (T30).

#### 5.5. Complexação com os ácidos nucleicos

Os complexos foram preparados pela adição extemporânea de pDNA ou ON às formulações. A adsorção foi realizada por mistura simples, em temperatura ambiente. As nanoemulsões e os ácidos nucleicos foram incubados por 30 min para facilitar a formação dos complexos. As concentrações finais de ON e pDNA nos complexos foram 7 µM e 0,06 µM, respectivamente. Os complexos obtidos foram denominados NE/pDNA e NEP/pDNA, ou NE/ON e NEP/ON, respectivamente. Em ambos os casos, variou-se a quantidade de cada formulação para que se obtivesse os complexos nas relações de cargas teóricas [+4/-]; [+2/-]; [+0,4/-] e [+0,2/-], que

corresponde à proporção de cargas positivas do lipídeo catiônico (presente nas formulações) para as cargas negativas de grupos fosfatos do pDNA ou ON.

#### 5.6. Padronização da técnica de retardamento em gel de eletroforese

Primeiramente foi determinada a concentração de agarose a ser utilizada, através de géis a 3% para ON, 1% para pDNA e 1,5% para os dois fragmentos simultaneamente. Por fim, testou-se a curva padrão para ambos em géis com concentração 1 % para pDNA e 2% para ON.

Também foi determinada a quantidade de SYBR® Gold a ser utilizada. A partir de uma solução 1:200 foram preparadas as proporções 2/8; 5/5; 8/2 (amostra:SYBR Gold). Após esse passo, foram construídas curvas padrão para os ácidos nucléicos livres, abrangendo as mesmas concentrações que foram adicionadas às formulações, bem como concentrações mais baixas, simulando complexações inferiores a 100%, tanto para ON quanto para pDNA.

Posteriormente, a formação do complexo entre as nanoemulsões catiônicas e os ácidos nucléicos foi avaliada de forma qualitativa através da técnica de retardamento em gel de eletroforese. A complexação de pDNA com as nanoemulsões catiônicas foi avaliada em gel de agarose 1% e dos ON em gel de agarose 2%. Utilizou-se tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) para o preparo do gel e como tampão de corrida. As condições eletroforéticas padronizadas foram voltagem de 90 V/cm, a 300 mA e 100 W por 40 minutos. Como corante foi utilizado SYBR® Gold e visualizado com o transiluminador UV do Gel docxr –Biorad (SCHU *et al.*, 2018).

Como controles foram utilizados os ácidos nucléicos livres (curva padrão), bem como as nanoemulsões brancas (não complexadas). A associação do ácido nucléico com a nanoemulsão foi considerada quando não aparecer banda de migração de pDNA ou ON livre no gel (YI *et al.*, 2000; BARUT *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005).

### 5.7. Análise estatística

As análises foram expressas em valores de média e desvio padrão e as comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA e Bonferroni, a um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização físico-química

Os resultados das propriedades físico-químicas das nanoemulsões brancas, caracterizadas imediatamente após o preparo (T0), encontram-se descritos na tabela 3.

**Tabela 3** - Caracterização físico-química das nanoemulsões (n=3).

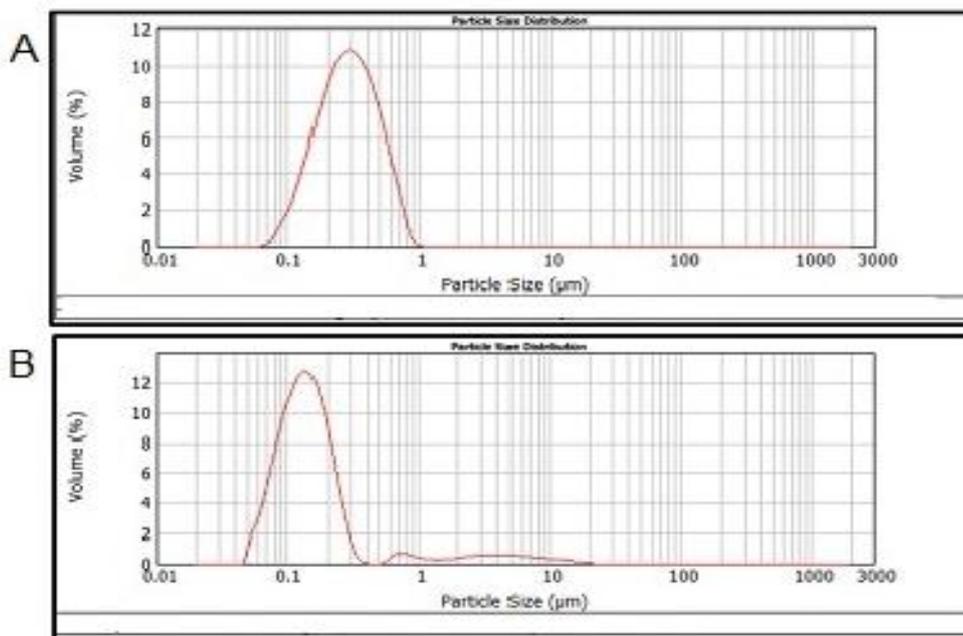
Formulação	D [4,3] (nm)	Span	PZ (mV)
NEP	304±0,07	1,45±0,12	37,6±3,23
NE	561±0,08	1,99±0,37	48,6±2,51

Legenda: NEP - Nanoemulsão com polissorbato 80; NE - Nanoemulsão sem polissorbato 80; Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

As nanoemulsões apresentaram diâmetros nanométricos (300-600 nm), de acordo com a literatura para este tipo de sistema (BRUXEL *et al.*, 2014; FRAGA *et al.*, 2008) e valores de SPAN inferiores a 2 (tabela 3), o que caracteriza uma distribuição unimodal (JUMAA e MULLER, 1998), como também pode ser visualizado pela presença de um único pico nos gráficos da figura 2.

A caracterização das propriedades físico-químicas de nanoemulsões é de suma importância, pois estas podem interferir diretamente desde a estabilidade até os aspectos biofarmacêuticos (RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004).

**Figura 2** - Distribuição dos tamanhos de gotículas das nanoemulsões.



Legenda: A – NEP (nanoemulsão com polissorbato 80); B – NE (nanoemulsão sem polissorbato 80).

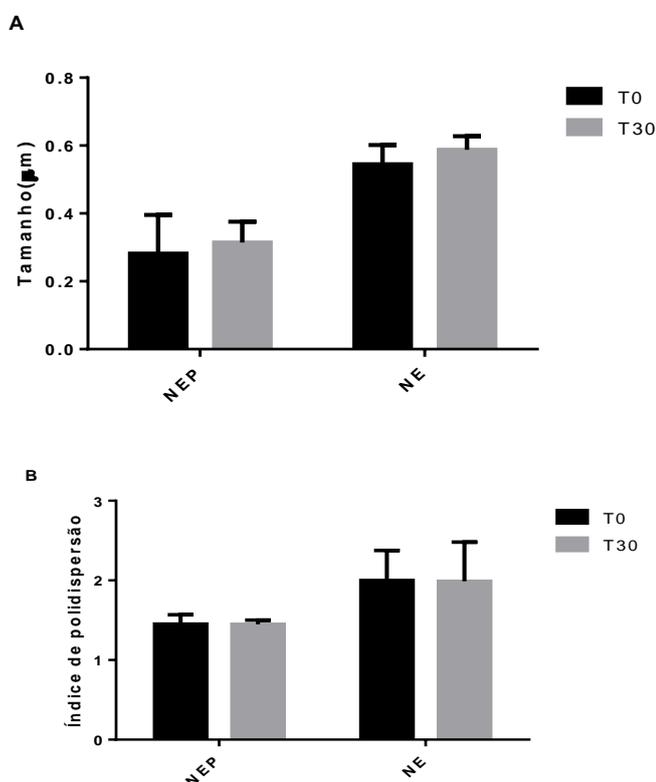
Nanoemulsões produzidas com polissorbato 80 (NEP) apresentaram distribuição mais homogênea (figura2), além de um menor diâmetro D [4,3] (tabela 3), pois a estabilização da emulsão ocorre adicionalmente por efeito estérico devido à presença das longas cadeias de óxido de etileno na interface (HOELLER, SPERGER e VALENTA, 2009). Para formulações isentas desse tensoativo, o mecanismo de estabilização ocorre essencialmente por repulsão de cargas (TEIXEIRA *et al.*, 2017) Outras características positivas em relação ao polissorbato 80 são: baixa toxicidade, biocompatibilidade e seu baixo custo (DOOST *et al.*, 2018). E ainda, Kim e colaboradores (2001) demonstraram uma maior atividade de transfecção para DNA veiculado em nanoemulsões contendo polissorbato 80 em relação aquelas contendo o tensoativo polaxamer 188.

Ambas as formulações apresentam um potencial Zeta entre +37 e +48 mV, devido à presença do lipídeo catiônico DOTAP nas formulações. O potencial Zeta é um parâmetro crítico na caracterização de nanoemulsões para veiculação de genes terapêuticos, pois o mesmo reflete a relação dos tensoativos formadores de filme interfacial ou em relação a presença de moléculas com carga na interface (HORMAN

e ZIMMER, 2016). Neste caso, a carga positiva é essencial para a formação do par iônico com os ácidos nucleicos que se deseja associar (TEIXEIRA *et al.*, 1999).

Visando avaliar se as propriedades físico-químicas mantinham-se ao longo de 30 dias, elas foram reavaliadas após armazenamento entre 4 e 8 °C (T30). Deve-se levar em conta que as emulsões tendem a sofrer uma redução de energia livre total, uma vez que seu diâmetro de gotícula aumenta e sua área interfacial diminui (TADROS *et al.*, 2004). Como pode ser observado na Figura 3, o diâmetro médio volumétrico D [4,3] e sua distribuição (Span) não apresentaram alterações significativas no período. Desta forma, pode-se inferir que a nanoemulsão se manteve estável termodinamicamente durante o período armazenado.

**Figura 3** - Comportamento físico-químico das NE durante o armazenamento por 30 dias.



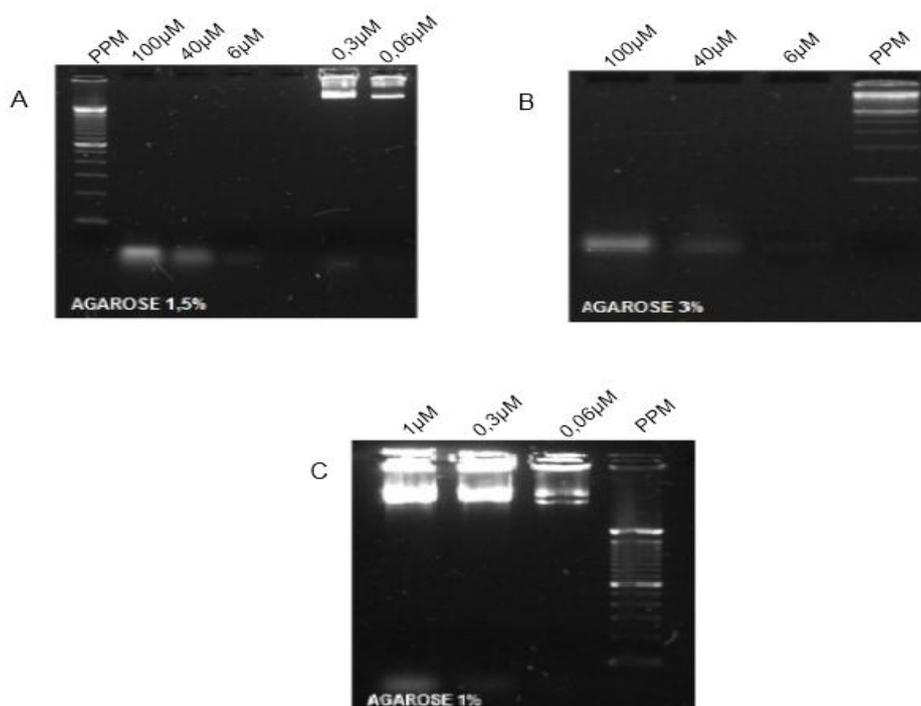
Legenda: A – Valores de D[4,3], tamanho médio da gotícula; B – Valores de Span, índice de polidispersão das gotículas; NEP – nanoemulsão com polissorbato 80; NE – nanoemulsão sem polissorbato 80; T0 – tempo zero; T30 – 30 dias de armazenamento.

## 6.2. Padronização dos parâmetros eletroforéticos

Sambrook e Russel (2001) avaliaram o papel importante da concentração de agarose na separação eletroforética, pois a mesma determina a porosidade do gel, que por sua vez influencia diretamente na capacidade de migração das moléculas de DNA. Para cada tamanho de ácido nucléico são recomendados materiais diferentes e/ou concentrações diferentes para produção do gel. Géis de agarose com percentual mais alto de agarose resultam em melhor separação e resolução de fragmentos menores. Por outro lado, géis com concentrações menores de agarose proporcionam uma maior mobilidade para fragmentos maiores (YILMAZ, OZIC e GOK, 2012). Baseado nesta premissa, otimizou-se a concentração de agarose para posteriormente avaliar a complexação do ON e pDNA a nanoemulsões.

A figura 4 demonstra os testes preliminares para a escolha das concentrações ideais de agarose. Inicialmente, visando utilizar a mesma concentração de agarose para visualizar os dois fragmentos, foi utilizado um gel com concentração de 1,5% (Figura 4 (A)). Como neste último caso não foi possível a visualização dos ON na concentração 6  $\mu$ M (utilizada nos complexos), optou-se pela continuidade da padronização de géis separados para os diferentes ácidos nucléicos. Então utilizou-se o gel a 3% para visualização dos ON (figura 4B), com objetivo de se aproximar da concentração sugerida pela literatura (4%). Na figura 4(C) foi utilizado o gel a 1% com a mesma intenção de se aproximar da concentração descrita pela literatura. Por fim, otimizou-se a concentração de 2% de agarose para ON e 1% para pDNA, representados nas figuras 6 e 7.

**Figura 4 - Avaliação preliminar da concentração de agarose.**

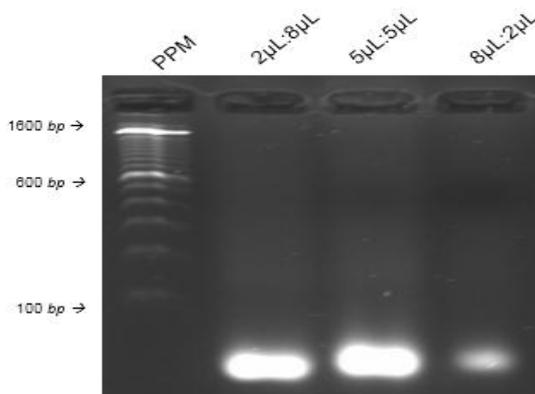


Legenda: Figura (A) ON e pDNA testados em gel de agarose a 1,5%. Padrão de peso molecular de 100 pb (PPM); Solução teste ON 100  $\mu\text{M}$  (1); Solução teste ON 40  $\mu\text{M}$  (2); Solução teste ON 6  $\mu\text{M}$  (3); Solução teste pDNA 0,3  $\mu\text{M}$  (4); Solução teste pDNA 0,06  $\mu\text{M}$  (5). (B): ON testado em gel de agarose a 3%. Solução teste ON 100  $\mu\text{M}$  (1); Solução teste ON 40  $\mu\text{M}$  (2); Solução teste ON 6  $\mu\text{M}$  (3); Padrão de peso molecular de 100 pb (PPM). (C) Plasmídeo testado em gel de agarose a 1%. Solução teste pDNA 1  $\mu\text{M}$  (1); Solução teste pDNA 0,3  $\mu\text{M}$  (2); Solução teste pDNA 0,06  $\mu\text{M}$  (3); Padrão de peso molecular de 100 pb (PPM).

Após a escolha do gel, foram determinadas as quantidades necessárias de SYBR Gold® e amostra para melhor visualização da banda. Determinar o volume de marcador a ser utilizado “*in locus*” é um passo determinante na corrida eletroforética, pois amostras sobrecarregadas podem permanecer no poço, ou ainda, o marcador dificultar a mobilidade do ácido nucléico (GREEN e SAMBROOK, 2012). Neste estudo foi utilizado o SYBR Gold® pela sua alta sensibilidade e maior segurança.

Conforme apresentado na figura 5, as proporções testadas mostraram-se efetivas para marcação do ácido nucléico com resultados equivalentes para a marcação de uma solução de ON na concentração de 7  $\mu\text{M}$ , e foi então selecionada para a continuidade dos experimentos.

**Figura 5** - Avaliação da proporção SYBR Gold e amostra para visualização dos oligonucleotídeos.

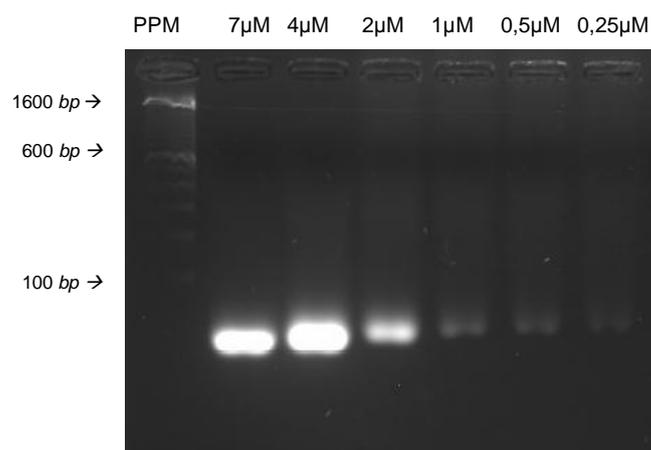


Legenda: Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Marcador de peso molecular; (B) 2 µL amostra/ 8 µL SYBR; (C) 5 µL amostra/ 5 µL SYBR; (D) 8 µL amostra/ 2 µL SYBR.

### 6.3. *Elaboração da curva-padrão das soluções de oligonucleotídeos livres*

Com objetivo de definir um limite de detecção para a técnica eletroforética, foi delimitada uma curva padrão decrescente a partir da concentração final de ON (7µM) presentes nas nanoemulsões. Sendo assim, as concentrações testadas foram: 7µM; 4µM; 2µM; 1µM; 0,5µM; 0,25µM. A figura 6 apresenta a migração das soluções de diferentes concentrações de oligonucleotídeos em gel de agarose a 2%.

**Figura 6** - Curva-padrão das soluções de oligonucleotídeos livres.



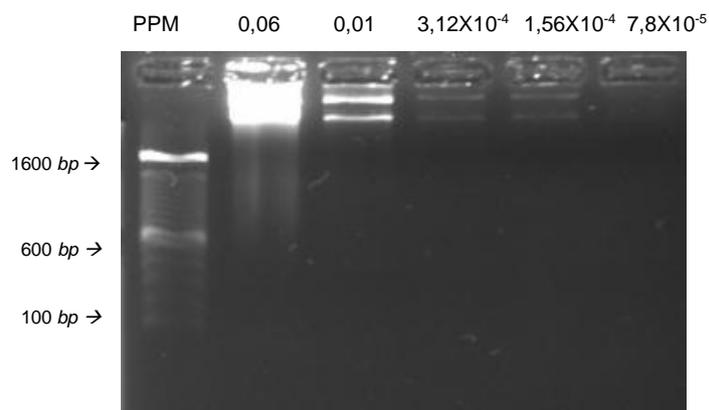
Legenda: Eletroforese em gel de agarose 2%.

Através da visualização de banda na concentração 0,25  $\mu\text{M}$ , pode-se sugerir que o limite de detecção é 28 vezes menor que a concentração de ON adicionados às formulações (7  $\mu\text{M}$ ). É importante ressaltar que existem parâmetros que influenciam no aparecimento da banda, dentre eles, está a relação concentração do gel *versus* tamanho do ácido nucléico. De acordo com a literatura, para fragmentos como o ON em questão (30 bases) a concentração de agarose recomendada seria no mínimo 4% (BURATOWSKI e CHODOSH, *et al.*, 2001).

#### 6.4. Elaboração da curva-padrão das soluções de plasmídeos livres

Da mesma forma que para o ON, construiu-se uma curva decrescente de concentrações para pDNA, com o objetivo de definir um limite de detecção para o mesmo. A solução com concentração mais elevada (0,06  $\mu\text{M}$ ) representa a mesma concentração adicionada às formulações. A partir desta, as concentrações testadas foram: 0,06; 0,01;  $3,12 \times 10^{-4}$ ;  $1,56 \times 10^{-4}$ ;  $7,8 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$ .

**Figura 7** - Curva-padrão das soluções de plasmídeos livres.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. As concentrações estão expressas em  $\mu\text{M}$ .

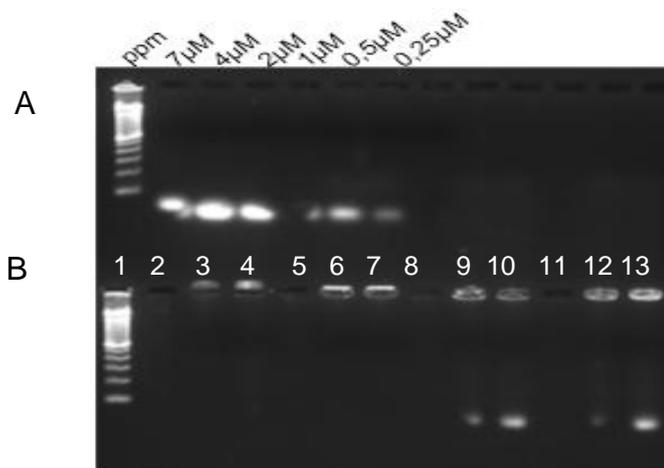
Observa-se que no poço onde foi adicionada a concentração  $7,8 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ , não foi possível visualizar a banda, o que pode ser explicado pelas limitações da técnica nas condições da padronização. A concentração de agarose utilizada foi de 1%, sendo esta preconizada pela literatura para fragmentos entre 400 e 8000 *pb*, garantindo assim uma melhor migração (BRODY e KEN, 2004).

Assim, pode-se sugerir que o limite de detecção é 384 vezes menor que a concentração de plasmídeo adicionado às formulações (0,06  $\mu\text{M}$ ).

#### 6.5. Avaliação da complexação dos ácidos nucleicos com as nanoemulsões

Alguns autores tem investigado a avaliação da influência da composição qualitativa (tipos de núcleo oleoso, proporção do mesmo, natureza dos fosfolipídeos e lipídeos catiônicos) das formulações, assim como os fatores que governam a interação e consequente liberação de oligonucleotídeos terapêuticos (TEIXEIRA, 2001; MARTINI *et al.*, 2008 HAGIGIT *et al.*, 2008).

**Figura 8** - Representação da avaliação da complexação do ON com as nanoemulsões.



Legenda: (A): Padrão de peso molecular de 100 *pb* (ppm); curva-padrão de oligonucleotídeos livres nas concentrações (B): ON complexado com as diferentes nanoemulsões na concentração de 7  $\mu\text{M}$ , mas em diferentes relações de carga [+/-]: NEP/ON [+4/-] (3); NEP/ON [+2/-] (4); NE/ON [+4/-] (6); NE/ON [+2/-] (7); NEP/ON [+0,4/-] (9); NEP/ON [+0,2/-] (10); NE/ON [+0,4/-] (12); NE/ON [+0,2/-] (13). As nanoemulsões NEP (2 e 8) e NE (5 e 11) foram utilizadas como controle.

A figura 8 representa a curva padrão de ON (8A) para comparação com as diferentes formulações complexadas com ON (8B). Primeiramente, não foi possível realizar a comparação da banda visualizada na curva padrão com as bandas dos complexos, pois a curva não mostrou linearidade. Em relação aos controles, é possível observar que os constituintes das formulações não apresentam interações com o corante marcador, pois não há visualização de banda nos poços 2, 5, 8 e 11, contendo as nanoemulsões brancas (livres de ácidos nucléicos).

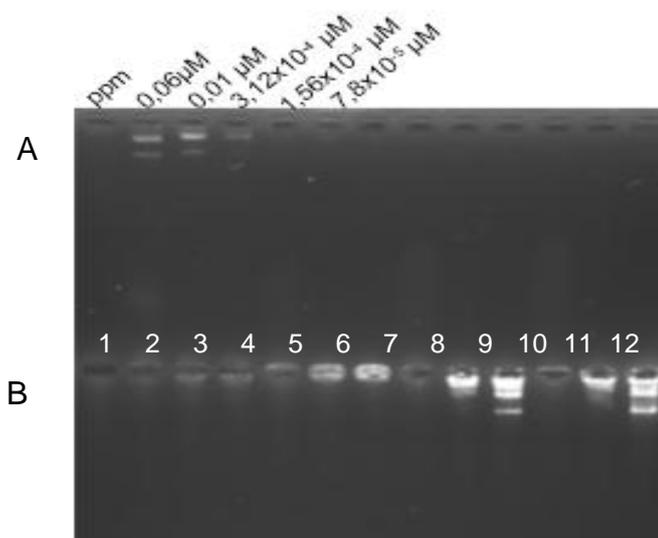
Foram então produzidos 4 diferentes complexos entre os ON e as duas diferentes formulações. Para uma mesma concentração de ácido nucléico (7  $\mu\text{M}$ ), variou-se a quantidade de nanoemulsão adicionada. Assim, obtiveram-se diferentes relações de cargas [+/-], que são teoricamente calculadas a partir do número de moléculas de lipídeo catiônico presente no complexo e do número de moléculas de ON (multiplicado pelo número de cargas negativas existente em cada molécula). Os resultados permitem sugerir que os complexos formados nas relações de cargas [+4/-] e [+2/-] interagem com os ON em sua totalidade, visto que não foi possível a visualização de banda. Logo, sugere-se que o ácido nucléico permaneceu no ponto de aplicação por estar complexado com a nanoestrutura. Em concordância com o resultado, as formulações brancas apresentaram potencial zeta positivo, o que

favorece a interação eletrostática entre o lipídeo catiônico e o fragmento. Trimaille e colaboradores (2003) verificaram através do ensaio eletroforético a complexação de alguns ácidos nucleicos com nanoestruturas e sugeriram que as interações eletrostáticas entre os grupamentos carregados positivamente do lipídeo catiônico (DOTAP) e os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos têm sido considerada a principal interação na complexação de nucleotídeos na interface óleo/água. Interações hidrofóbicas entre os lipídeos do núcleo oleoso e os ON também têm sido relatadas (BRUXEL *et al.*, 2014).

Em contrapartida, os complexos produzidos nas relações de cargas [+0,4/-] e [+0,2/-], não foram capazes de associar todas as moléculas de ON, pois foi possível a visualização de bandas. Esses resultados sugerem que as moléculas de ON devem estar parcialmente associadas às formulações, devido à baixa disponibilidade de sítios positivamente carregados nestes complexos. E ainda, a capacidade de associação parece diminuir com a diminuição da relação [+/-], devido ao aumento da intensidade das bandas. Quanto à presença de polissorbato 80, não foi possível diferenciar a capacidade de complexação das duas diferentes formulações através desta técnica.

A figura 9 apresenta os resultados da curva padrão de pDNA (9A) e da avaliação da complexação do ácido nucleico com as formulações (9B) em gel agarose 1%. Os complexos foram formados a partir de uma concentração de 0,06  $\mu\text{M}$  de pDNA nas mesmas relações de carga [+/-] testadas para os ON.

**Figura 9** - Representação da avaliação da complexação do pDNA com as nanoemulsões.



Legenda: Painel (A): Padrão de peso molecular de 100 *pb* (); curva-padrão de pDNA livres nas concentrações de 0,06  $\mu\text{M}$  (b), 0,01  $\mu\text{M}$  (c),  $3,12 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$  (d),  $1,56 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$  (e) e  $7,8 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$  (f). Painel (B): pDNA complexado com as diferentes nanoemulsões na concentração de 0,06  $\mu\text{M}$ , mas em diferentes relações de carga [+/-]: NEP/pDNA [+4/-] (3); NEP/pDNA [+2/-] (4); NE/pDNA [+4/-] (6); NE/pDNA [+2/-] (7); NEP/pDNA [+0,4/-] (9); NEP/pDNA [+0,2/-] (10); NE/pDNA [+0,4/-] (12); NE/pDNA [+0,2/-] (13). As nanoemulsões NEP (2 e 8) e NE (5 e 11) foram utilizadas como controle.

Fraga (2008) avaliou a complexação de nanoemulsões com pDNA pela técnica de retardamento em gel de eletroforese e observou que o plasmídeo pode ficar em solução na fase externa das nanoemulsões. Contudo no nosso estudo para os complexos com relações de carga [+4/-] e [+2/-] não foi observado banda, pode-se então inferir que tenha ocorrido a complexação. Além disso, observa-se a retenção do complexo no ponto de aplicação outro indicativo de formação do mesmo.

Já para os complexos com relações de carga [+0,4/-] e [+0,2/-], infere-se que os mesmos foram incapazes de complexar todas as moléculas de pDNA. Conseqüentemente, foi possível a visualização de banda, que demonstra a presença de pDNA livre e pode-se sugerir que não tenha ocorrido a complexação completa. Isto se explica pela diminuição das cargas positivas nesses complexos, logo o número de grupamentos fosfatos presentes no pDNA não foram capazes de interagir eletrostaticamente e foi possível a visualização de banda.

Observou-se também que as formulações com relação de carga [+0,2/-] apresentaram bandas mais intensas em relação as relações de carga [+0,4/-], sendo

explicado pela diminuição da concentração de lipídeo catiônico nesses complexos, com isso aumenta a proporção de pDNA livre.

De maneira geral, interações eletrostáticas governam interações entre pDNA e lipídeos catiônicos, sendo que a relação de cargas é o principal fator que influencia a taxa de associação de pDNA com nanoemulsões (BARUT *et al.*, 2005; FRAGA, 2008).

Em relação a presença ou não de polissorbato 80, não foi possível diferenciar a capacidade de complexação das formulações através dessa técnica. Da mesma maneira que não foi possível fazer essa diferenciação para as formulações complexadas com ON.

A manutenção da concentração de ácidos nucléicos (pDNA e ON) adicionados nas formulações, permitiu que fosse possível a realização das comparações das intensidades das bandas entre as formulações, corroborando com Yi e colaboradores (2000) que avaliaram diferentes relações de carga mantendo fixa a concentração de ácido nucléico utilizada.

Outra característica importante, é que a curva-padrão em cada experimento deve ser aperfeiçoada para que possibilite uma análise quantitativa de qual a relação de carga seria o limite, ou seja, até que ponto seria possível a complexação. O presente trabalho permitiu identificar o limite dentre as relações de cargas testadas, porém ainda se faz necessário o aperfeiçoamento da técnica. Deve-se salientar que mesmos os ácidos nucléicos testados terem tamanhos distintos foi possível inferir que a relação de cargas limite para a complexação foi a mesma.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, a técnica de emulsificação espontânea proporcionou a obtenção de emulsões catiônicas em tamanho nanométrico, tanto na ausência como na presença de polissorbatos 80. Além disso, o trabalho permitiu padronizar parâmetros eletroforéticos para avaliar a complexação de ON e pDNA a estas formulações. Foram definidos os limites de detecção de 0,25  $\mu\text{M}$  para o ON e de  $1,56 \times 10^{-4} \mu\text{M}$  para o pDNA avaliados.

Em relação à complexação entre os ácidos nucleicos (ON e pDNA) e as diferentes formulações, não foi possível observar diferenças em relação à composição dos carreadores. Já as relações de carga mostraram-se importantes fatores para a complexação de ON e pDNA. Em ambos os casos, as relações de carga [+4/-] e [+2/-] foram capazes de manter os ácidos nucleicos complexados às formulações. Em contrapartida, os complexos com relações de carga [+0,4/-] e [+0,2/-] não permitiram a associação de todas as moléculas dos ácidos nucleicos, pois foi possível a visualização de banda nos géis, demonstrando que com a diminuição de sítios positivos aumenta a proporção de ácidos nucleicos não ligados. Somado a isso, salienta-se que apesar dos ácidos nucleicos testados neste trabalho terem tamanhos muito distintos, o limite de complexação em relação de cargas [+2/-] mostrou-se o mesmo através da técnica utilizada

### 7.1. Perspectivas

- ✓ Aprimorar a curva padrão para avaliar de forma quantitativa o grau de complexação;
- ✓ Avaliar outras relações de carga para definir um limite de complexação;
- ✓ Aperfeiçoar a técnica para testes com outros ácidos nucleicos de interesse.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKAR, L. M. *et al.* **PLGA-Chitosan nanoparticle-mediated gene delivery for oral cancer treatment: A brief review.** Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing, 2017. p. 012117.

BARUT, K. D. *et al.* **Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system.** Turkish Journal of Chemistry, v. 29, n. 1, p. 27-40, 2005.

BESSIS, N. *et al.* **Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms.** Gene Therapy, v. 11, n. S1, p. S10, 2004.

BIVAS-BENITA, M. *et al.* **Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization.** Journal of Controlled Release, v. 100, n. 1, p. 145-155, 2004.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. **History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis.** Analytical Biochemistry, v. 333, n. 1, p. 1-13, 2004.

BROWN, T. A. **Gene Cloning and DNA Analysis: an introduction.** John Wiley & Sons, p. 45-71, 2010.

BURATOWSKI, S.; CHODOSH, L. A. **Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis.** Current Protocols in Molecular Biology, p. 12.2. 1-12.2. 11, 2001.

BRUXEL, F. *et al.* **Cationic nanoemulsion as a delivery system for oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II.** International Journal of Pharmaceutics, v. 416, n. 2, p. 402-409, 2011.

\_\_\_\_\_. **Adsorption of antisense oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II on cationic nanoemulsions optimized by a full factorial design.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 14, n. 9, p. 1161-1171, 2014.

CAMASSOLA, M. *et al.* **Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model.** Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 28, n. 6, p. 1035-1043, 2005.

COTRIM, A. P.; BAUM, B. J. **Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects.** Toxicologic Pathology, v. 36, n. 1, p. 97-103, 2008.

DE LAPORTE, L. *et al.* **Design of modular non-viral gene therapy vectors.** Biomaterials, v. 27, n. 7, p. 947-954, 2006.

DOOST, A. S. *et al.* **Influence of non-ionic emulsifier type on the stability of cinnamaldehyde nanoemulsions: A comparison of polysorbate 80 and hydrophobically modified inulin.** Food Chemistry, v. 258, p. 237-244, 2018.

FATTAL, E.; BARRATT, G. **Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA.** British Journal of Pharmacology, v. 157, n. 2, p. 179-194, 2009.

FRAGA, M. *et al.* **Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells.** International Journal of Nanomedicine, v. 6, p. 2213, 2011.

\_\_\_\_\_. **Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model.** International Journal of Nanomedicine, v. 12, p. 2061, 2017.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual 4th ed.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

HAGIGIT, T. *et al.* **Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye.** Journal of Controlled Release, v. 145, n. 3, p. 297-305, 2010.

\_\_\_\_\_. **The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic nanoemulsions.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 70, n. 1, p. 248-259, 2008.

HARDEE, C. L. *et al.* **Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy.** Genes, v. 8, n. 2, p. 65, 2017.

HUNG, C. *et al.* **Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 289, n. 1-2, p. 197-208, 2005.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. **Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, n. 1-2, p. 181-186, 2009.

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. **Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions—A review.** *Journal of Controlled Release*, v. 223, p. 85-98, 2016.

JAGANI, H. V. *et al.* **Improvement of therapeutic efficacy of PLGA nanoformulation of siRNA targeting anti-apoptotic Bcl-2 through chitosan coating.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 4-5, p. 611-618, 2013.

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

JUMAA, M; MÜLLER, B W. **The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 163, n. 1-2, p. 81-89, 1998.

KAWAKAMI, S. *et al.* **Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 2, p. 726-745, 2008.

KHACHANE, P. V. *et al.* **Cationic nanoemulsions as potential carriers for intracellular delivery.** *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 2, p. 188-194, 2015.

KIM, I. S.; PARK, J.; KIM, K. **Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry.** *Applied Geochemistry*, v. 16, n. 11-12, p. 1419-1428, 2001.

KIM, T. W. *et al.* **The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer.** *Journal of Controlled Release*, v. 82, n. 2-3, p. 455-465, 2002.

\_\_\_\_\_. **Polycations enhance emulsion-mediated in vitro and in vivo transfection.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 295, n. 1-2, p. 35-45, 2005.

LECHARDEUR, D. *et al.* **Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 5, p. 755-767, 2005.

LEE, S. V; BAHAMAN, A. R. **Discriminatory power of agarose gel electrophoresis in DNA fragments analysis.** In: *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. InTech, p. 42-56, 2012.

LV, H. *et al.* **Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 114, n. 1, p. 100-109, 2006.

MAIRHOFER, J.; GRABHERR, R. **Rational vector design for efficient non-viral gene delivery: challenges facing the use of plasmid DNA.** *Molecular Biotechnology*, v. 39, n. 2, p. 97-104, 2008.

MARTINI, E. *et al.* **Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, n. 1-2, p. 280-286, 2008.

MCCLOREY, G., WOOD, M. J. **An overview of the clinical application of antisense oligonucleotides for RNA-targeting therapies.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 24, p. 52-58, 2015.

MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. **Nonviral vectors for gene delivery.** *Chemical Reviews*, v. 109, n. 2, p. 259-302, 2008.

NAM, H. Y. *et al.* **Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers.** *Archives of Pharmacal Research*, v. 32, n. 5, p. 639-646, 2009.

OPALINSKA, J. B.; GEWIRTZ, A. M. **Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 7, p. 503, 2002.

QIAN, C. *et al.* **Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility.** *Food Chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1440-1447, 2012.

RABINOVICH-GUILATT, L *et al.* **Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions.** *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 131, n. 1, p. 1-13, 2004.

SCHUH, R. S. *et al.* **Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses.** *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 13, n. 12, p. 1709-1718, 2016.

\_\_\_\_\_. **Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses.** *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 13, n. 12, p. 1709-1718, 2016.

\_\_\_\_\_. **Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 122, p. 158-166, 2018.

SILVA, A. L. *et al.* **Stearylamine-containing cationic nanoemulsion as a promising carrier for gene delivery.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 2, p. 1339-1345, 2016.

SINGH, Y. *et al.* **Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 252, p. 28-49, 2017.

SLATER, G. W.; GUO, H. L. **An exactly solvable Ogston model of gel electrophoresis II. Sieving through periodic gels.** *Electrophoresis*, v. 17, n. 9, p. 1407-1415, 1996.

STELLWAGEN, N. C. **Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution.** *Electrophoresis*, v. 30, n. S1, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition.** Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK, 2001. Acesso em: 21 jun 2018. Disponível em < <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>>.

SOKOLOVA, V.; EPPLE, M. **Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells.** *Angewandte Chemie International Edition*, v. 47, n. 8, p. 1382-1395, 2008.

TAJIK, S. *et al.* **MangiferinDNA biosensor using double-stranded DNA modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 720, p. 134-138, 2014.

TATEISHI-KARIMATA, H.; SUGIMOTO, N. **Structure, stability and behaviour of nucleic acids in ionic liquids**. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 14, p. 8831-8844, 2014.

TEIXEIRA, H. *et al.* **Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides**. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 1, p. 30-36, 1999.

\_\_\_\_\_. **Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids**. *Biophysical Chemistry*, v. 92, n. 3, p. 169-181, 2001.

\_\_\_\_\_. **Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através da técnica de emulsificação espontânea**. *Caderno de Farmácia*. Porto Alegre, RS. Vol. 18, n. 2 (jul./dez. 2002), p. 89-93, 2002.

\_\_\_\_\_. **Cationic nanoemulsions for nucleic acids delivery**. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017.

Thermo Fisher Scientific Inc. **Protein Gel Electrophoresis Technical Handbook**. Acesso em 21 jun 2018. Disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/na-electrophoresis-education/na-electrophoresis-workflow.html>.

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. **Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy**. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, n. 5, p. 346, 2003.

TADROS, T. *et al.* **Formation and stability of nano-emulsions**. *Advances in colloid and interface science*, v. 108, p. 303-318, 2004.

TRIMAILLE, T.; PICHOT, C.; DELAIR, T. **Surface functionalization of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles with poly (ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 221, n. 1-3, p. 39-48, 2003.

VERISSIMO, L. M. *et al.* **Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy**. *Journal of Drug Targeting*, v. 18, n. 5, p. 333-342, 2010.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. **Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes.** *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 2, p. 255-264, 2006.

WOLD, W. S. M.; TOTH, K. **Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy.** *Curr. Gene Ther.*, v. 13, p. 421–433, 2013.

YI, S. *et al.* **A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum resistant gene delivery system.** *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 3, p. 314-320, 2000.

YIN, H. *et al.* **Non-viral vectors for gene-based therapy.** *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 8, p. 541, 2014.

YILMAZ, M.; OZIC, C.; GOK, İ. **Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis.** In: *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. InTech, 2012.

ZHI, D. *et al.* **The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery.** *Bioconjugate Chemistry*, v. 24, n. 4, p. 487-519, 2013.