AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A NANEMULSÕES CATIÔNICAS POR ELETROFORESE

Mariani Machado Vasconcellos [1]

Renata Hilgert [2]

Ursula da Silveira Matte [3]

Helder Ferreira Teixeira [4]

Fernanda Bruxel [5]

Cleci Menezes Moreira [6]

Resumo:

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. A terapia gênica surge como nova alternativa terapêutica, a mesma consiste na resolução de um problema pela inserção de um material genético exógeno para células específicas. No entanto, ácidos nucléicos exigem um sistema de entrega seguro e eficaz, como as nanoemulsões catiônicas. O objetivo do trabalho foi produzir nanoemulsões catiônicas e estudar a complexação de plasmídeo e oligonucleotídeo modelos às formulações por eletroforese. Para avaliação da taxa de complexação foi utilizada a técnica de retardamento em gel de eletroforese. Como resultado, as nanoemulsões apresentaram potenciais zeta positivos e diâmetros nanométricos (300-600 nm), de acordo com a literatura para este tipo de sistema. As relações de carga mostraram-se importantes fatores para a complexação. Observou-se que a medida que diminui os sítios catiônicos aumentam os ácidos nucléicos livres.

Palavras-chave: Terapia gênica; Nanoemulsões catiônicas; Ácidos Nucléicos

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A NANEMULSÕES CATIÔNICAS POR ELETROFORESE

[1] Aluno de graduação. marianivasconcellos@gmail.com. Autor principal

[2] Aluna de Graduação. renatahilgert88@gmail.com. Co-autor

[3] Pós-graduação. umatte@hcpa.edu.br. Co-autor

[4] Docente. helder.teixeira@ufrgs.br. Co-autor

[5] Docente. fb.unipampa@gmail.com. Orientador

[6] Docente. clecim2@gmail.com. Co-orientador

AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS MODELOS A NANOEMULSÕES CATIÔNICAS POR ELETROFORESE

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 (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). A terapia consiste na resolução de um problema pela inserção de um material genético exógeno para células específicas.

Neste viés, a literatura, tem avaliado o uso de fragmentos de DNA em fita simples, também chamados de oligonucleotídeos antisenso, 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 nucléicos não são espontaneamente ocupados pelas células, pois apresentam elevado peso molecular e caráter polianiônico o que dificulta aproximação das membranas celulares (NAM *et al*., 2009). Neste sentido, o desenvolvimento de um sistema de entrega seguro e eficaz, torna-se fundamental. Para contornar esses problemas, uma variedade de sistemas nanocarreadores têm sido desenvolvidos, dentre os quais destacam-se as nanoemulsões catiônicas. Surge assim a necessidade de avaliar o grau de complexação dos ácidos nucléicos a estes carreadores. Neste contexto, o trabalho tem por objetivo produzir nanoemulsões catiônicas e estudar a complexação de diferentes ácidos nucléicos modelos (plasmídeo e oligonucleotídeo) às formulações, através de eletroforese.

2 METODOLOGIA

As nanoemulsões foram compostas por triglicerídeos de cadeia média, lecitina, lipídeo catiônico, glicerol e água, contendo polissorbato 80 ou não. 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/-].

Para avaliação da taxa de complexação foi utilizada a técnica de retardamento em gel de eletroforese. Para avaliar a formação dos complexos com um plasmídeo e oligonucleotídeo modelos, utilizaram-se géis de agarose a 1 e 2%, respectivamente.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

As nanoemulsões apresentaram potenciais zeta positivos (superiores a +35 mV) e diâmetros nanométricos (300-600 nm), de acordo com a literatura para este tipo de sistema (BRUXEL *et al*., 2014; FRAGA *et al*., 2017), além de valores de SPAN inferiores a 2, o que caracteriza uma distribuição unimodal (JUMAA e MULLER, 1998).

Para a avaliação da complexação, a técnica eletroforética 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 utilizada. Em relação a presença ou não de polissorbato 80, não foi possível diferenciar a capacidade de complexação das formulações através desta técnica. De maneira geral, interações eletrostáticas governam interações entre ácidos nucléicos e lipídeos catiônicos, sendo que a relação de cargas é o principal fator que influencia a taxa de associação com nanoemulsões (BARUT *et al*., 2005; FRAGA, 2011).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, a técnica de emulsificação espontânea proporcionou a obtenção de emulsões catiônicas em tamanho nanométrico. As relações de carga mostraram-se importantes fatores para a complexação de oligonucleotídeo e plasmídeo modelos, visto que com a diminuição de sítios positivos (relações de cargas menores que [+0,4/-]) aumenta a proporção de ácidos nucléicos não ligados.

REFERÊNCIAS

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, p. 012117, 2017.

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.

BRUXEL, F. *et al***. 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.

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

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.

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

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.

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.

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.

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.