



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – GENÉTICA E
BIOTECNOLOGIA**

Judith Maria de Oliveira Guimarães

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO EM TRANSFEÇÃO CELULAR**

2019

Juiz de fora

Judith Maria de Oliveira Guimarães

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO EM TRANSFEÇÃO CELULAR**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Oliveira Camargo

Co-orientadora: Prof. Dra. Michele Munk

2019

Juiz de Fora

Judith Maria de Oliveira Guimarães

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO EM TRANSFEÇÃO CELULAR**

Aprovada em:

de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Oliveira Camargo - Orientador
EMBRAPA

Prof. Dra. Michele Munk- Co- orientadora
UFJF

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão- Pesquisador
EMBRAPA (externo).

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba -
UFJF

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos – Suplente UFJF

Dra. Camila Guimarães Almeida- Suplente (externo)- UFJF

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a meus pais por apoiarem as minhas decisões e por terem dado todo o suporte necessário que permitiu esse momento.

Ao orientador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por todos os ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo durante minha estada no LRA.

A co-orientadora Dra. Michele Munk Pereira, por todos os ensinamentos, paciência e ajuda.

Ao Humberto de Mello Brandão e Camila Guimarães, pelo apoio, por todos os ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo durante todos esses anos que foram fundamentais para a realização do trabalho.

Aos meus amigos, por estar ao meu lado durante todos os momentos, por mais tumultuados que fossem oferecendo todo o carinho e suporte necessários.

Ao Gustavo, por ter me ensinado enormemente desde que entrou no laboratório, por estar sempre ao meu lado auxiliando na realização do trabalho.

Aos funcionários e amigos do laboratório por toda ajuda durante o trabalho, pelas risadas e conselhos, sem vocês esse trabalho não teria sido realizado e nem teria a mesma graça.

À minha família e aos meus amigos por me escutarem, darem força e apoio nos meus estudos.

Aos órgãos de fomento, à EMBRAPA Gado de Leite e à Universidade Federal de Juiz de Fora, a rede de Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (RM PI-BEN) Processo No. TEC - RED-00282-16 - FAPEMIG Redes de Pesquisa CTI, a rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (AGRONANO), a FAPEMIG (APQ-02342-17) por possibilitarem minha formação em todos os âmbitos.

Aos membros da banca por me proporcionarem mais essa oportunidade de aprendizado.

Resumo

A abordagem da engenharia genética em animais envolve diversos tipos de tecnologias direcionadas para a produção de Animais Geneticamente Modificados (AGMs). Uma etapa essencial para a produção de AGM consiste no carregamento *in vitro* de material genético em células somáticas. Contudo, as técnicas desenvolvidas para o carregamento gênico não têm sido eficientes devido as falhas na transfecção e integração do transgene que estão relacionados a diversos fatores. Atualmente, novas alternativas surgiram para a entrega eficiente de DNA exógeno, como a utilização de nanocarreadores, devido sua capacidade de interação com material genético e internalização celular. O objetivo deste estudo é sintetizar e caracterizar nanopartículas (NPs) de quitosana visando aplicações em transfecção de células somáticas. A síntese da NP de quitosana foi realizada pelo método de gelificação iônica. O plasmídeo utilizado foi o PEF- GFP clonado na *E. coli* stbl3 e purificado seguindo o protocolo do kit QIAprep® Spin Maxprep. As NPs foram caracterizadas pela técnica de DLS que revelou uma variação de tamanhos de acordo com as proporções utilizadas desde nanopartículas com 117,7nm a 313,9nm. Dentre os tratamentos testados, optou-se pela proporção de 6/1/1 com NP livres variando o diâmetro médio de 124,7 a 142,7 nm para a realização dos ensaios de transfecção. O nanocomplexo contendo DNA plasmidial/TPP/NPs de quitosana apresentou diâmetro variando de 387,2nm e 284,4nm e o nanocomplexo DNA plasmidial/ NPs de quitosana apresentou diâmetro variando de 351,9nm e 369,7nm. Foram realizados vários ensaios de transfecção alterando produção de NPs com e sem TPP, tempo de exposição, pH, potencial Zeta e uso de meios DMEM ou PBS/SFS. O tratamento em que os nanocomplexos foram preparados com TPP, usando PBS/SFB, pH 6,5 e as células HEK 293 ficaram expostas por 24 horas aos nanocomplexos apresentaram uma melhor eficiência de transfecção (8,25%) em relação aos outros tratamentos. Portanto, os resultados demonstraram que o pH e o tempo de exposição aos nanocomplexos influenciam na taxa de transfecção celular utilizando NP de quitosana. Palavras Chaves: Nanotecnologia, nanopartículas de quitosana e carregamento gênico.

Abstract

The approach of genetic engineering in animals involves several types of technologies directed to the production of Genetically Modified Animals (AGMs). An essential step for the production of AGM is the in vitro transport of genetic material into somatic cells. However, the techniques developed for gene loading have not been efficient due to the failures in transfection and transgene integration that are related to several factors. Currently, new alternatives have emerged for the efficient delivery of exogenous DNA, such as the use of nanocarriers, due to their ability to interact with genetic material and cellular internalization. The aim of this study is to synthesize and characterize the of nanoparticles (NPs) of chitosan for transfection application. The synthesis of NP of chitosan was performed by the ionic gelation method. The plasmid used was PEF-GFP cloned in *E. coli* stbl3 and purified following the QIAprep® Spin Maxprep kit protocol. NPs were characterized by the DLS technique that revealed a variation of sizes according to the proportions used from nanoparticles with 117.7nm to 313.9nm. Among the treatments tested, the ratio of 6/1/1 with free NP varied from 124.7 to 142.7 nm for the transfection assays. The nanocomplex containing plasmid DNA / TPP / NPs of chitosan had a diameter varying from 387.2nm and 284.4nm and the nanocomplex DNA plasmid / chitosan NPs presented a diameter varying from 351,9nm and 369,7nm. Several transfection assays were performed altering production of NPs with and without TPP, exposure time, pH, Zeta potential and use of DMEM or PBS / SFS media. The treatment in which the nanocomplexes were prepared with TPP using PBS / SFB, pH 6.5 and the HEK 293 cells were exposed for 24 hours to the nanocomplexes showed a better transfection efficiency (8.25%) in relation to the other treatments. Therefore, the results demonstrated that the pH and time of exposure to the nanocomplexes influence the cellular transfection rate using chitosan NP. Key words: Nanotechnology, chitosan nanoparticles and gene loading.

Lista de ilustrações

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um lipossoma. Fonte: TORRE & PINHO,2015.....	17
Figura 2: Representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas (a). microspóia eletrônica de transmissão de lipossomas multilamelares (b), lipossomas unilamelares pequenos (c) e lipossomas multivesiculares (d). Fonte: TORRE & PINHO, 2015.....	18
Figura 3: Mecanismo de transfecção proposta por FELGNER e RINGOLD (1989)..	19
Figura 4: Modelo para a incorporação de complexos de PEI/DNA por células aderentes. Fonte: DEMENEIX, BEHR, 2005.....	21
Figura 5: Técnica de microinjeção. Fonte: BERTONCINI, 2009.....	22
Figura 6: Etapas da técnica de clonagem. Fonte: TRECENTI & ZAPPA. 2013.	24
Figura 7: Transferência de genes mediada por células tronco embrionárias: Fonte: EIBE (1998).....	26
Figura 8: Escala manométrica. Fonte WONG et al, 2017.	29
Figura 9: Diferenças entre nanoesferas e nanocápsulas. (AOUADA, 2009).	30
Figura 10: Desacetilação da quitina formação da quitosana. Fonte: OLIVEIRA JUNIOR, 2006.....	32
Figura 11: Esquema da obtenção de quitina e quitosana. Fonte: AOUADA, 2009. .	34
Figura 12: Processo geral de gelificação iônica. Fonte: LIMA, 2013.....	36
Figura 13: Processo de Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio. Fonte: NEVES, 2013	36
Figura 14: Interação entre as cargas negativas do TPP e a dos grupos aminos da quitosana. Fonte: BERGER et al., 2004.....	37
Figura 15: Potencial Zeta. Fonte: Zeta Potential Overview, da empresa Brookhaven Instruments.....	38
Figura 16: Ilustração princípio do funcionamento do AFM. Fonte: HAUGSTAD, 2012.	40
Figura 17: Desenho geral dos estudos de transfecção gênica utilizando nanopartículas de quitosana em diferentes modelos biológicos> HEK 293.	43
Figura 18: Primeiro ensaio de transfecção composto pelos tratamentos variando tempo de 24, 3 e 6 horas, presença e ausência de TPP, e de SFB.....	48

Figura 19: Ensaio de eletroforese em gel dos plasmídeos selecionados para testar a integridade de cada um deles. Os plasmídeos selecionados foram: PSZ-GREEN (1), PAC-GFP(2), PGK-GFP(3), e PLL, 3.7 (4), PEF-GFP(5) e PCMV-GFP(6).....	50
Figura 20: Mapa do vetor plasmidial PEF- GFP, usado no estudo.....	50
Figura 21: Ensaio de restrição utilizando a enzima Not 1 para avaliar a integridade do plasmídeo PEF-GFP por ensaio de eletroforese em gel agarose a 1%.	51
Figura 22: Imagem 3D obtida Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de quitosana complexadas com O plasmídeo PEF-GFP que provocou um crescimento destas esferas composta com tamanhos que variam entre 209 a 329 nm.	55
Figura 23: Corrida em agarose, avaliação da incorporação de plasmídeo à nanopartícula de quitosana. 1 e 2 representam o plasmídeo livre na concentração de 1500 ng/μl e o número 3 representa a NP de quitosana complexada com o plasmídeo na concentração de 160 μg/ml.....	55
Figura 24: Análise do diâmetro média dos nanocomplexos durante os dias 1, 8 e 16. Não houve diferença significativas entre os tratamentos.	56
Figura 25: Análise do potencial Zeta dos nanocomplexos durante os dias 1, 8 e 16. Houve diferença significativa entre os dias 1/8 e 8/16. Diferenças significativas entre os tratamentos indicados por ** P< 0,0014.	57
Figura 26: Ensaio de eletroforese em gel de NPs de quitosana livre (1), nanocomplexos (2) e plasmídeo livre (3), para verificar a estabilidade do nanocomplexo nos dia 1°(A), 8° (B) e 16° (C).....	57
Figura 27: Ensaio de transfecção testando diferentes proporções de nanocomplexos/DMEM com diferentes pHs, em células HEK 283.	58
Figura 28: Células HEK 293 Transfectadas com nanocomplexos e analisadas no microscópio de fluorescência para analisar a expressão do GFP nas seguintes proporções 1/7 (A, A'), 1/8 (B, B'), 1/9 (C, C'), 1/10 (D, D'), 1/11 (E, E') e 1/12 (F, F'), no aumento de 10x.....	59
Figura 29: Influência de diferentes pHs na transfecção com nanocomplexos em HEK-293. Citograma bidimensional em dot plot de SCC (escala logarítima) X FSC (escala linear).....	61
Figura 30: Intensidade de Fluorescência (%) nos diferentes tratamentos em função da variação do pH e tempo de exposição aos nanocomplexos. Diferenças significativas entre os grupos expostos ao nanocomplexos e ao controle são indicados por *** P< 0,0001; ** P< 0,001; *P<0,005.....	62

Figura 31: Variação do potencial Zeta na solução contendo nanocomplexos e PBS/SFB. A medida que o pH aumenta a carga passa a ser negativa.63

Figura 32: Intensidade de Fluorescência (%) nos diferentes tratamentos em função da variação do pH e diferença de concentração de nanocomplexo (pH6,5*). Diferenças significativas entre os grupos expostos ao nanocomplexos e ao controle são indicados por * $P < 0,05$63

Lista de tabelas

Tabela 1: Aplicações biomédicas da quitosana.....	35
Tabela 2: Nanopartículas versus partículas maiores: características, biocinética e efeitos (trato respiratório como portal de entrada). Fonte: OBERDORSTER, 2009..	41
Tabela 3: Descrição dos plasmídeos utilizados, quanto a seu tamanho, proteína que expressa e enzima de restrição.....	44
Tabela 4: Análise espectrométrica dos plasmídeos PEF-GFP e PCMV-GFP.....	49
Tabela 5: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livres em diferentes proporções.....	52
Tabela 6: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livres e complexadas com TPP e sem TPP na proporção de 6:1:1.....	53
Tabela 7: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas complexadas em meio DMEM com soro e sem soro.....	54
Tabela 8: Ensaio de estabilidade das nanopartículas, analisadas no DLS.....	56
Tabela 9: Variação do pH antes e após a transfecção em diferentes proporções de nanocomplexos e DMEM.....	59

Lista de abreviaturas e siglas

AFM: Microscopia de Força Atômica;

AGMs: Animais geneticamente modificado;

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid;

EIV: Vesículas obtidas por injeção de éter;

FPV: Vesículas obtidas em prensa de French;

FT-IR: Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier;

GFP: Green fluorescent protein;

GPT: Xantina/guanine fosforribosiltransferase;

HEK293: Human Embryonic Kidney 293 cells

HIV: Vírus da imunodeficiência humana;

HPH: Fosfotransferase da hidromicina;

LV: Lentivirais;

MLV: Vírus Leucemia murina;

NEO: Neomicina fosfotransferase;

NPs: Nanopartículas;

OMG: Organismos geneticamente modificados

PCL: Poliacrinato e Policaprolactona;

PDI: Índice de polidispersão;

PEI: Transfecção por polyethylenimine;

PURO: Puromicina N acetiltransferase;

REV: Vesículas obtidas por evaporação;

RNA: Ácido ribonucleico;

SCTN: Transferência nuclear de células somáticas;

SIN: Self inactivating;

STM: Microscópio de varredura por sonda;

TE: Tris-EDTA

TN: Transferência nuclear;

TPP: Tripolifosfato;

VSV: Vírus da estomatite vesicular.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. TRANSFECCÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	17
2.1.1. LIPOFECCÃO	17
2.1.2. ELETROPORAÇÃO	19
2.1.3. TRANSFECCÃO POR POLYETHYLEMINE (PEI)	20
2.2. MICROINJEÇÃO PRÓ- NUCLEAR	21
2.3. CLONAGEM ANIMAL (Transferência nuclear com células somática).	23
2.4. TRANSFERÊNCIA DE GENES MEDIADA POR CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS	25
2.5. TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR LENTIVÍRUS	27
2.6. NANOTECNOLOGIA	29
2.6.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	30
2.6.2. QUITOSANA	32
2.6.3. GELIFICAÇÃO IÔNICA	35
2.6.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS	37
2.6.5. NANOTOXIDADE	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. DENILEAMENTO EXPERIMENTAL	43
4.2. CLONAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	43
4.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	45
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E NANOCOMPLEXOS	46
4.5. CULTURA DE CÉLULAS HEK 293	47
4.6. ENSAIOS DE TRANSFECCÃO <i>IN VITRO</i>	47
4.6.1. Primeiro ensaio (Transfecção em células HEK 293)	47
4.6.2. Segundo ensaio (Transfecção utilizando diferentes tipos de pH em células HEK 293).	48
5. RESULTADOS	49

5.1. CLONAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	49
5.2. Síntese e caracterização das nanopartículas.....	51
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A engenharia genética é uma das áreas da biotecnologias que mais vem se destacando nas últimas décadas (DAIGNEAULT, *et al.*, 2018; ISHINO, *et al.*, 2018; WANG, *et al.*, 2018). Os genomas dos organismos podem ser alterados pela inserção, deleção ou inativação do material genético, e assim produzir organismos geneticamente modificados (OGM) (CALIÓ e BERTONCINI, 2017). Técnicas mais recentes de engenharia genética envolvem a edição do genoma e podem ser usadas para fixar alelos desejáveis em uma população, contribuindo para o melhoramento genético (BASTIAASEN *et al.*, 2018) sem a necessidade de gerar OGM. Avanços na manipulação genética *in vitro* de organismos permitiu a produção de OGMs que beneficiam diversas áreas, como as indústrias farmacêutica, biomédica e agrícola. A manipulação genética em várias espécies é possível devido a semelhança no funcionamento da maquinaria celular responsável pela transcrição e tradução do DNA entre elas (CALIÓ e BERTONCINI, 2017).

A modificação genética dos animais tem sido usada na pesquisa médica para criar modelos para estudo de doenças humanas. Esses modelos ajudam a identificar as vias da doença e permitem a avaliação de novas terapias. A análise da função gênica pode ser conduzida em animais geneticamente modificados (AGMs) para se obter informações importantes para aprofundar o entendimento do desenvolvimento biológico (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017). Além disso, animais transgênicos têm sido utilizados na produção de proteínas de cunho terapêutico, e podem ser úteis para a produção de xenotransplantes (SELF, *et al.*, 2018; SONG, *et al.*, 2018). Na agricultura, estudos estão sendo desenvolvidos para produzir AGMs resistentes a doenças, produzir alterações desejáveis para as taxas de crescimento ou taxa de conversão alimentar, produção de carne mais magra, e melhorar as propriedades antimicrobianas do leite para animais recém-nascidos (BATERSON, *et al.*, 2001; COUTINHO, *et al.*, 2010; PAULA, *et al.*, 2017).

A abordagem da engenharia genética em animais envolve diversos tipos de tecnologias direcionadas para a produção de AGMs. Esse foco de produção se deu a partir dos estudos de Gordon *et al.*(1980); Gordon e Ruddle, (1981), o qual desenvolveu modelos de estudo transgênico em camundongos, que foram depois

realizados também em outras espécies. Algumas das metodologias mais empregadas para este fim consistem da microinjeção de construtos de DNA em oócitos fertilizados; transferência gênica mediada por células tronco embrionárias geneticamente modificadas, e a transferência gênica em oócitos e embriões mediada por retrovírus (GORDON & RUDDLE 1981, HAMMER *et al.* 1985, GOSSLER *et al.* 1986, HOFMANN *et al.* 2003, 2004). Em animais domésticos, como bovinos, a transferência nuclear com células somáticas (TNCS, chamada também de clonagem animal) geneticamente modificadas tem sido a metodologia de escolha (Keefer 2015).

Os vetores para entrega gênica em células somáticas têm como objetivo a alteração gênica. No entanto, as técnicas desenvolvidas para o carregamento de genes não têm sido eficientes devido a falhas de transfecção e integração, tornando um desafio a produção de vetores seguros e eficazes para a entrega de genes alvos. Atualmente, novas alternativas surgiram para a entrega eficiente de DNA exógeno, como o uso de vetores não virais, devido sua baixa imunotoxicidade (RAMAMOORTHY & NARVEKAR, 2015).

A utilização de nanotecnologias vem crescendo a cada dia e ganhando espaço em diversas áreas, tais como indústria têxtil, eletrônicos, agricultura, biomedicina, indústria farmacêutica e meio ambiente (TAVARES, 2011; FARIA-TISCHER e TISCHER, 2012; DÚRAN e MARCATO, 2013; NEVES, 2013). A nanotecnologia é considerada como um dos mais importantes avanços nas tradicionais áreas do conhecimento e constituem um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados (AOUADA, 2009). Neste contexto, materiais na escala nanométrica podem ser utilizados para o direcionamento de material genético em células somáticas, gametas e em embriões (BARKALINA *et al.*, 2015; HASANZADER *et al.*, 2016; ZANIBONIA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; NEAGOE *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2010, MUNK *et al.* 2016).

As nanopartículas podem ser um método alternativo de modificação genética, uma vez que materiais na escala nanométrica podem ser utilizadas como ferramentas para o carregamento de DNA exógeno para dentro de células somáticas, Assim, a nanotecnologia pode contribuir em diversas áreas como na produção de animais geneticamente modificados e na terapia genica, entre outros. O presente trabalho objetivou sintetizar e avaliar nanopartículas de quitosana visando a

produção de um nanocarreador alternativo de DNA plasmidial portando gene repórter eGFP (proteína verde fluorescente) em células somáticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Células somáticas podem ser transfectadas e selecionadas durante cultivo *in vitro*. Diversas técnicas e com estratégias diferentes estão disponíveis e permitem o carregamento do DNA para dentro da célula. Contudo, todos possuem suas limitações.

2.1.1. LIPOFEÇÃO

A lipofecção é a técnica que utiliza os lipossomos, capazes de transportar genes para o interior das células. Lipossomos são vesículas coloidais microscópicas, sua estrutura é formada através da automontagem de lipídios anfifílicos formando uma bicamada lipídica concêntrica, intercaladas por um meio aquoso (Figura 1) (TAN *et al.*, 2014a; BALBINO *et al.*, 2012). Esse sistema lipossomal podem encapsular substâncias hidrofílicas no compartimento aquoso e substâncias lipofílicas inseridas ou absorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica, aplicações alimentares e aplicações analíticas (MORAES *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2013).

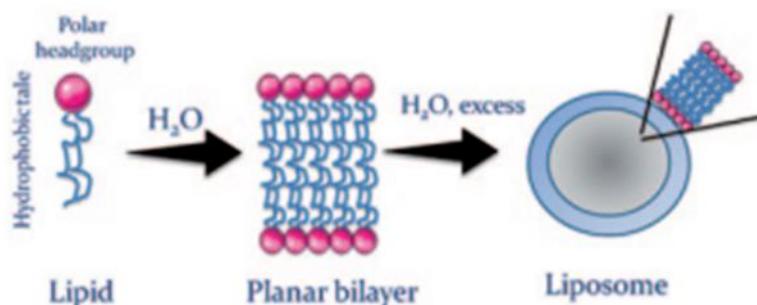


Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um lipossoma. Fonte: TORRE & PINHO, 2015.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com sua composição e modo de preparo em unilamelar (Possui apenas uma camada dupla e o tamanho da vesícula é de 100nm), multilamelar (mais de uma lamela) e multivesicular (mais de um núcleo aquoso) (Figura 2). Quanto ao método preparo podem ser definidos como: REV (vesículas obtidas por evaporação em fase reversa), FPV (vesículas obtidas em prensa de French) e EIV (vesículas obtidas por injeção de éter) (BATISTA, *et al.*, 2007).

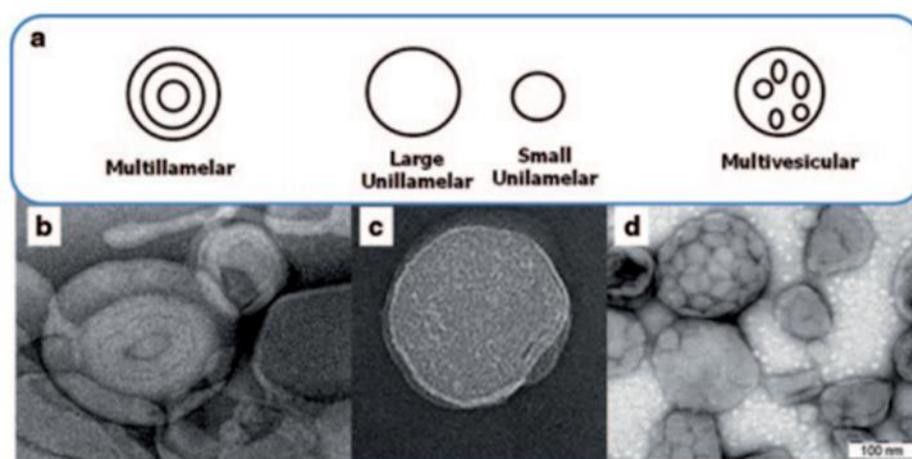


Figura 2: Representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas (a). microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas multilamelares (b), lipossomas unilamelares pequenos (c) e lipossomas multivesiculares (d). Fonte: TORRE & PINHO, 2015.

Em 1964 os lipossomos foram caracterizados por Bangham & Horne que observaram através do auxílio do microscópio eletrônico à formação de vesículas compostas de bicamadas fechadas intercaladas por compartimento de água, característica pela qual faz o lipossomo uma ferramenta para o transporte de nucleotídeos às células (BALBINO *et al.* 2012).

Os primeiros estudos utilizando o lipossomos foi em 1989 realizados por Felgner e Ringold que relataram um método de ação para os reagentes com lipossomo, baseado na ligação de uma fita de DNA linear em quatro lipossomos. Esses fusionam com a membrana celular e o DNA é liberado para o citoplasma (Figura 3). Contudo a técnica apresentava algumas desvantagens e lacunas tais como o auto custo de lipossomo para formar o complexo, considerar o equilíbrio das cargas lipídicas entre as bicamadas interna e externa e não levar em consideração as implicações geradas pelas diferenças estruturais entre o DNA linear e o DNA circular enovelado (GROLL, 2003).

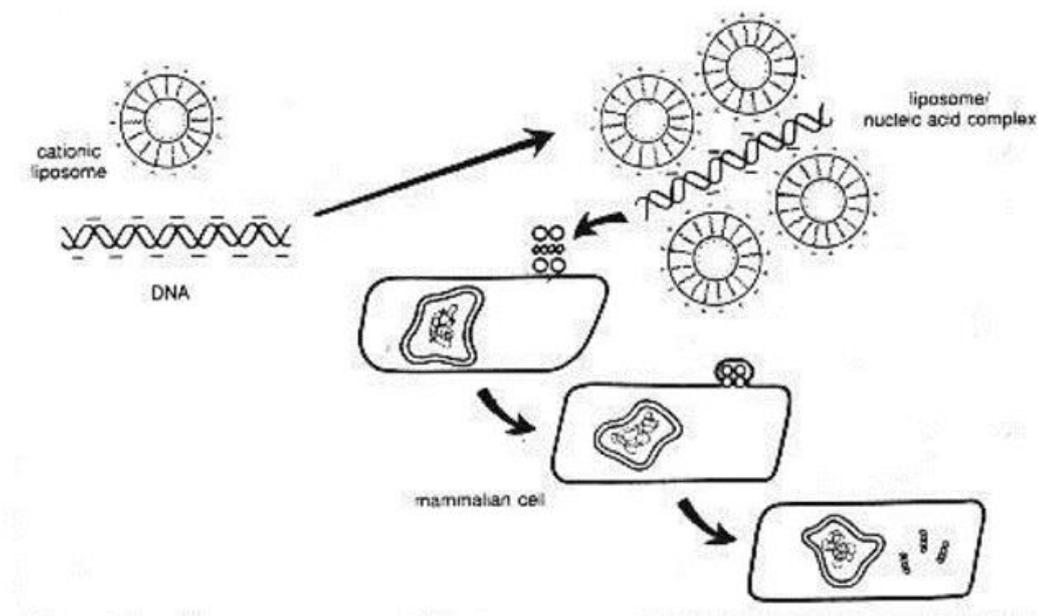


Figura 3: Mecanismo de transfecção proposta por FELGNER e RINGOLD (1989).

Para a eficácia da lipofecção devem ser consideradas algumas condições, tais como a condensação de DNA na estrutura do lipoplexo e sua proteção contra degradação por nucleases intracelulares e extracelulares; adesão do complexo DNA-lipídio à membrana celular; internalização do lipoplexo via endocitose; destabilização da membrana endocitótica ou endossômica pelo lipoplexo; escape do DNA da endocitose compartimento; transporte de DNA para o núcleo; dissociação do DNA do componente lipídico catiônico e expressão gênica bem sucedida. As interações entre o lipossomo catiônico e o DNA acontece por ligações eletrostáticas devido a diferenças de carga entre eles (DÜZGÜNE, 2003).

2.1.2. ELETROPORAÇÃO

A eletroporação consiste em um método físico baseado na entrega gênica à célula alvo, oriunda de descargas elétricas de alta tensão necessárias para introduzir o material genético, seja DNA ou RNA (Ácido ribonucleico) (POTTER; HELLEF, 2011). Essa técnica foi estabelecida por Neumann *et al.* (1982) que ao utilizarem descargas elétricas de alta voltagens, percebeu a formação de poros na membrana plasmática das células, onde seria possível a passagem de macromoléculas para o citoplasma. Entretanto para que essas macromoléculas (DNA/RNA) sejam introduzidas nas células são necessárias além da permeabilização da membrana, outras condições para que isso ocorra. Essas condições são:

migração do DNA/RNA em direção a membrana, interação do material genético com a membrana, entrada no citoplasma, migração até o núcleo e a passagem através do envelope nuclear (ROSAZZA *et. al*, 2011; WU e YUAN, 2011).

A eletroporação abrange uma grande variedade de células, incluindo as células que são resistentes a outros métodos de transfecção. Podem ser empregadas para analisar a expressão transitória de genes clonados e também auxilia na descrição de linhagens de células que carregam cópias ligadas ao gene de interesse (POTTER; HELLEF,2011).

Apesar de apresentar alta frequência de transformação e ser considerada uma técnica simples em comparação com as demais técnicas, a eletroporação possui algumas desvantagens tais como o alto índice de mortalidade das células, o tipo e o tamanho das células influenciam nas condições da voltagem. Deve-se levar em consideração a concentração de células a serem usadas, uma vez que baixas densidades celulares rendem baixa eficiências de transfecção enquanto que altas densidades favorecem processos indesejados de fusão entre as células (NEUMAM *et. al*,1982).

2.1.3. TRANSFECÇÃO POR POLYETHYLEMINE (PEI)

A polietilenoimina, ou PEI, é um polímero catiônico característica pela qual permite sua ligação com o DNA que possui carga negativa formando complexos. Essa propriedade faz com que a PEI seja utilizada para entrega de DNA no interior das células sendo considerada um padrão ouro para transfecção *in vitro* (MOHAN, *et al.*, 2012). O tipo de célula alvo, o peso molecular, ramificações, razão N/P entre os grupos amina da polietilenoimina (N) e os grupos fosfato do ácido nucleico (P), e tamanho do complexo, são fatores que influenciam na eficiência da PEI (THOMAS, *et al*, 2005).

Após a formação do complexo PEI-DNA ocorre a endocitose do complexo pelas células, dentro das células estes complexos migram para núcleo, onde o DNA é liberado (Figura 4) (SILVA, 2017).

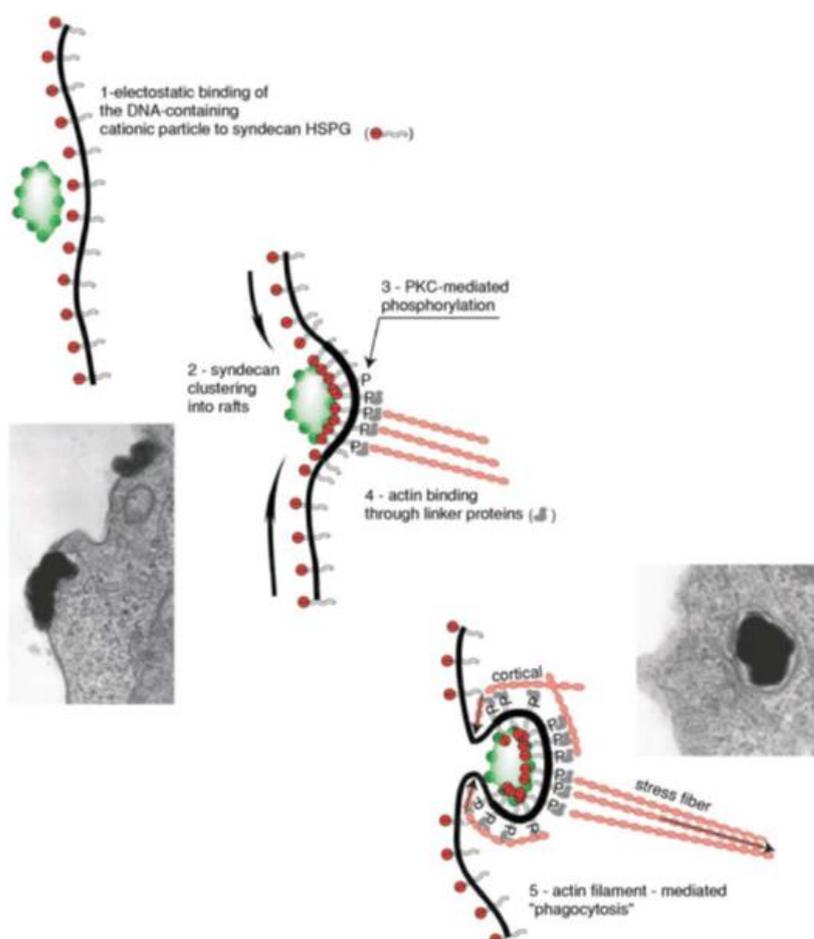


Figura 4: Modelo para a incorporação de complexos de PEI/DNA por células aderentes. Fonte: DEMENEIX, BEHR, 2005.

O método PEI apresenta algumas vantagens como a sua baixa citotoxicidade para grande parte das células. Porém algumas condições devem ser levadas em consideração para que a PEI seja realizada de forma obter níveis satisfatórios de transfecção, entre elas deve-se estabelecer qual a concentração de PEI é a mais adequada, além de qual o tempo de incubação necessário para a este polímero ultrapassar a membrana citoplasmática das células (SILVA, 2017).

2.2. MICROINJEÇÃO PRÓ- NUCLEAR

A microinjeção pró-nuclear é uma técnica que no princípio foi desenvolvida em camundongos e envolve a introdução direta de um construto de DNA dentro do pró núcleo de um oócito fertilizado (Figura 5) (CHRENEK, 2017).

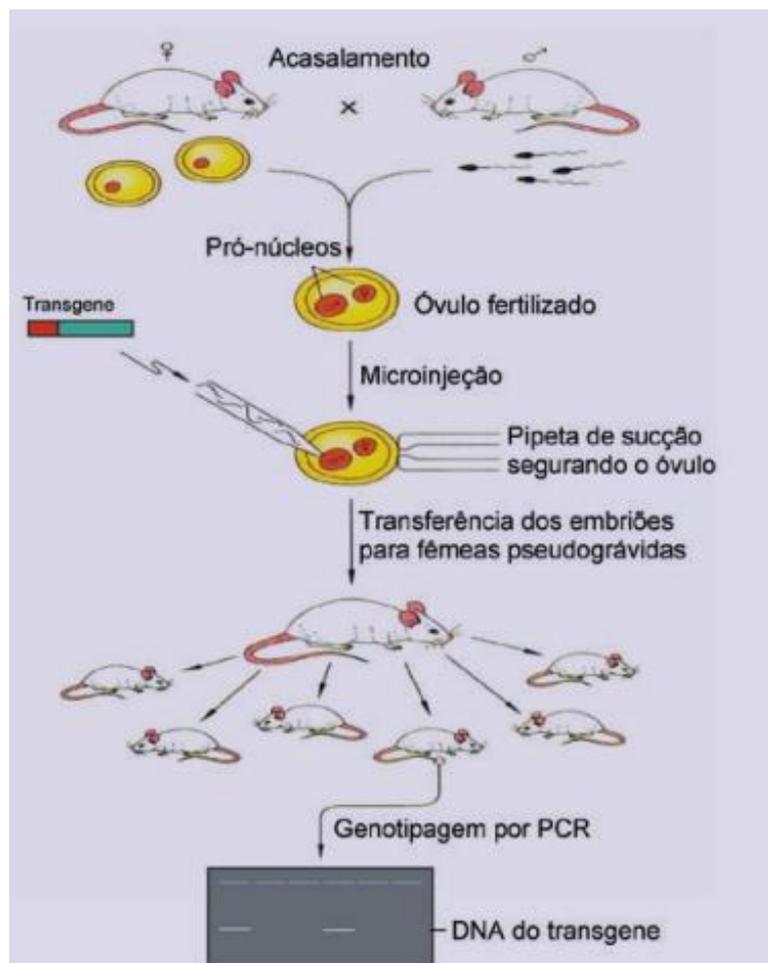


Figura 5: Técnica de microinjeção. Fonte: BERTONCINI, 2009.

Para desenvolvimento da técnica geralmente um plasmídeo é construído, no qual um gene ou um cDNA de interesse são colocados sob controle de um gene heterólogo promotor, que será responsável pela expressão do transgene. A transfecção ocorre por meio da microinjeção desse cassete transgênico dentro do pró-núcleo de um oócito fertilizado (zigoto). Em seguida, esse DNA exógeno vai se integrar de forma aleatória e geralmente na forma de blocos, podendo conter múltiplas cópias do fragmento de interesse (SOSA *et al*, 2010). Após desenvolvimento desse embrião até a fase de blastocisto, o mesmo é transferido para um animal receptor, gerando possivelmente um animal transgênico. Esse animal é caracterizado como hemizigoto, pelo fato do DNA exógeno estar presente em apenas um dos cromossomos, não existindo nenhum alelo correspondente no cromossomo homólogo.

Entre as vantagens, pode-se considerar este método como sendo simples, porém laborioso, na qual a transfecção ocorre de forma mais direta. Além disso, não existe um limite ao certo em relação ao tamanho do inserto de DNA a ser

utilizado na técnica, porém sabe-se que fragmentos maiores integram em menor quantidade de cópias. E a técnica pode ser aplicada em uma vasta variedade de espécies, como coelhos (CHRENEK, 2017), vacas (YUM *et al*, 2016), peixes (AVSAR-BAN *et al*, 2013), camundongos (MASHIKO *et al*, 2013), entre outras.

Em relação às desvantagens, como citado anteriormente a técnica é considerada laboriosa, pois os zigotos devem ser contidos com auxílio de uma micropipeta e seus pronucleos microinjetados um de cada vez de forma manual ou automática (CHRENEK, 2017). Em determinadas espécies, como bovinos e suínos, o pronúcleo não está visível, requerendo maiores manipulações. Além disso, é possível que o inserto integre-se em um local que não permita sua devida expressão, ou então que ele cause alguma mudança nos processos fisiológicos do animal. É possível também que durante a realização da microinjeção o DNA dos animais progenitores seja prejudicado, o que implicará em falhas no desenvolvimento do embrião. Outra limitação consiste da impossibilidade de aplicação da técnica em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário e também de ocorrer, ocasionalmente, a integração do fragmento em mais de um local e em mais de uma cópia, o que refletirá em um padrão variável de expressão do transgene na prole (WAKCHAURE *et al*, 2015).

Dentro desse contexto, a microinjeção pro-nuclear apesar de ter a grande vantagem de poder ser aplicada em diversas espécies ela também conta com uma baixa taxa de sucesso na produção de animais transgênicos, em torno de 3 a 5% (CLARK E WHITELOW, 2003). Outro fator correlacionado que também prejudica a adoção e aplicação da técnica consiste no requerimento de equipamento de micromanipulação.

2.3. CLONAGEM ANIMAL (Transferência nuclear com células somática).

Associada a produção *in vitro* de embriões, a produção de animais domésticos transgênicos foi estimulada pelo advento da clonagem animal realizada com linhagens de células somáticas doadoras de núcleo modificadas geneticamente. O primeiro exemplo foi em 1997, com o nascimento de duas ovelhas clones transgênicas para o fator IX de coagulação humano (SCHNIEKE *et al*, 1997), nascidas logo após a ovelha Dolly (WILMUT *et al*, 1997). O maior benefício da técnica é permitir o uso de células que foram adequadamente selecionadas com a

manipulação genética desejada e assim garantir a presença da construção gênica em toda a prole, evitando a produção de animais quimeras ou portadores de modificações indesejáveis resultantes da inserção aleatória do inserto em regiões codificantes do genoma (BRESSAN *et al.*, 2013).

Contudo, a clonagem é considerada uma técnica complexa devido as diferentes metodologias utilizadas gerando uma ampla variação dos resultados no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário *in vitro* até o pós-nascimento. No geral a técnica apresenta as seguintes etapas: retirada do núcleo do oócito receptor denominada enucleação, preparação e transferência do núcleo da célula doadora para espaço perivitelino, fusão entre as membranas do oócito e da célula, ativação do complexo reconstruído, cultivo temporário dos embriões reconstruídos e transferência para a receptora ou armazenagem em nitrogênio líquido (NIEMANN *et al.*, 2008).

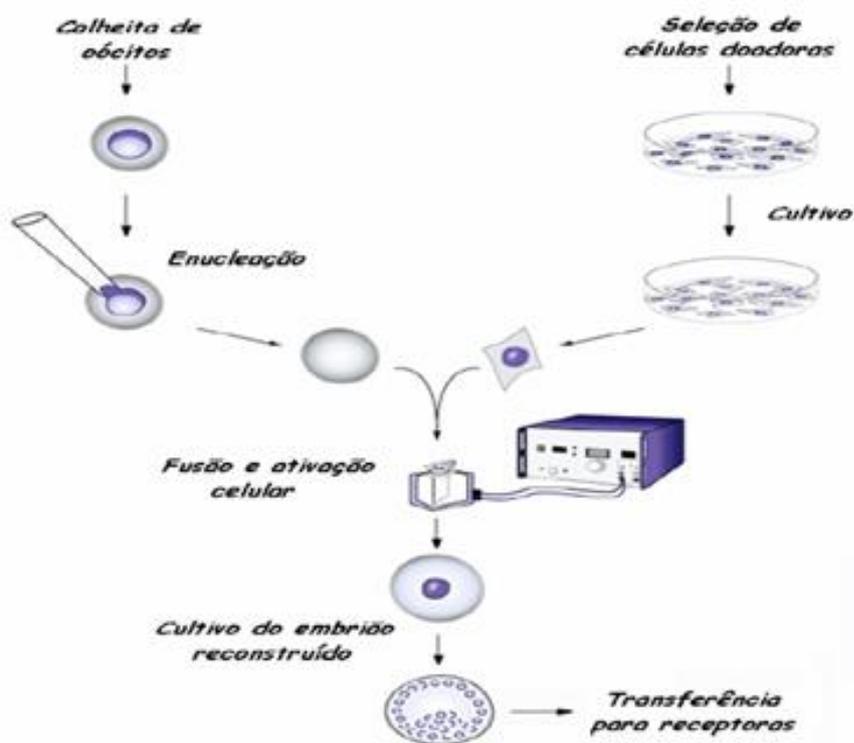


Figura 6: Etapas da técnica de clonagem. Fonte: TRECENTI & ZAPPA. 2013.

A conversão de células somáticas em um estado de totipotência através da reprogramação celular é uma importante etapa para o sucesso da clonagem animal e consequente produção de animais clones (LIANG *et al.*, 2018). Contudo sua eficiência é baixa devido a problemas como uma falha na reativação transcricional dos genes embrionários durante a reprogramação celular do núcleo

doador somático (AKAGI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012) resultando em baixa taxa de nascimento e sobrevida nos primeiros meses após nascimento (POWELL *et al.*, 2004).

A SCNT foi demonstrada previamente em anfíbios Briggs e King (1952) e Gurdon *et al.* (1958), onde permitiu analisar a habilidade do núcleo oocitário em reprogramar totalmente o núcleo da célula somática à totipotência. Essa técnica apresenta algumas limitações tais como: dilemas sociais em aceitar produtos da pecuária clonada e seus descendentes na cadeia alimentar, alto custo do desenvolvimento da técnica (US \$ 15.000 a US \$ 20.000 cada) e baixa taxa de sucesso (MOORE & HASLER, 2017).

2.4. TRANSFERÊNCIA DE GENES MEDIADA POR CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

Essa tecnologia foi desenvolvida em torno do ano 1980 com os trabalhos de GOSSLER *et al.* (1986). As células tronco, são células pluripotentes, sendo caracterizadas por serem indiferenciadas, mantendo a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido durante o desenvolvimento embrionário. O princípio desta técnica consiste em retirar células da massa celular interna de um blastocisto, que são células ainda indiferenciadas, e introduzir DNA exógeno de interesse. Em seguida, essas células são reintroduzidas em determinado embrião ainda em estágio inicial de desenvolvimento para colonizar os tecidos e esse embrião então é transferido para o útero de um animal receptor que será responsável pelo seu desenvolvimento até o nascimento. O embrião gerado corresponderá a um animal quimera, ou seja, um animal composto por duas populações celulares geneticamente distintas entre elas (LEVINE E GRABEL, 2017). A partir desse animal quimera, são realizados cruzamentos para que então possa ser obtido um animal transgênico, e a partir disso a modificação genética pode ser propagada como parte do genoma do animal criando linhagens específicas para a modificação de interesse (Figura 7) (SOSA *et al.*, 2010).

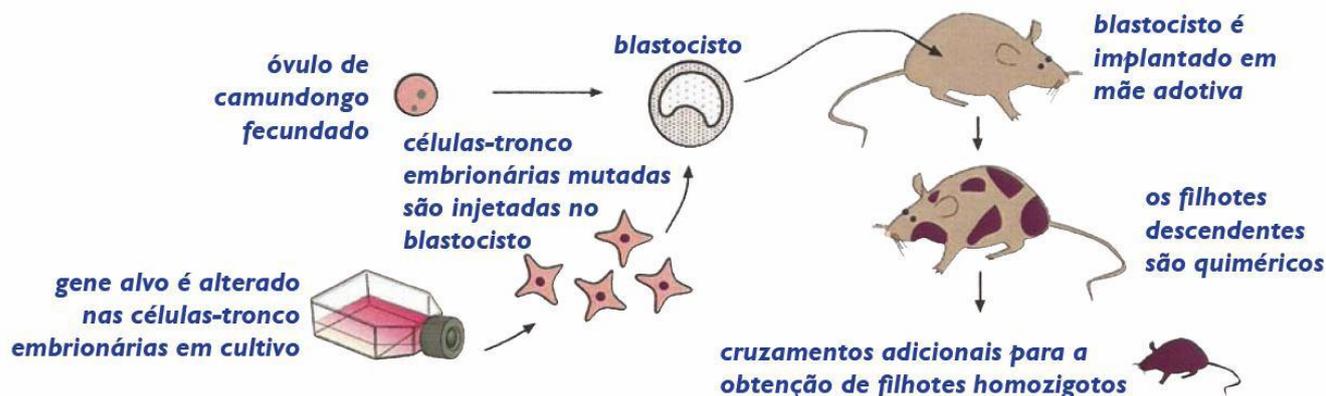


Figura 7: Transferência de genes mediada por células tronco embrionárias: Fonte: EIBE (1998).

Esta metodologia teve uma aplicação expressiva na produção de animais *knockouts*, na qual um vetor era construído com o objetivo de permitir a precisa remoção de um ou diversos éxons de um gene, levando a ausência de produção da proteína final ou de uma produção não funcional da proteína, que foi especialmente importante em estudos de expressão gênica em processos de desenvolvimento (WAKCHAURE *et al*, 2015). Além disso, a técnica também foi utilizada na modificação de genes criando apenas uma única mudança de nucleotídeo, produzindo o animal *knockin*. (SOSA *et al*, 2010).

Portanto, algumas das vantagens oferecidas por esta técnica incluem o uso de gene *targetting*, possibilitando a inserção de DNA direcionada a um local específico, induzindo a remoção de um dos genes originais da célula e substituí-lo por uma outra versão modificada do mesmo gene. Além disso, também é possível detectar as células que incorporaram o transgene ainda nos estágios iniciais, pois os vetores carregam genes de resistência de antibiótico ou sensibilidade, facilitando a seleção apenas de células recombinantes (WAKCHAURE *et al*, 2015). Gene de resistência para neomicina fosfotransferase (*neo*), fosfotransferase da higromicina (*hph*), puromicina Nacetiltransferase (*puro*) e xantina/guanina fosforribosiltransferase (*gpt*) estão entre os genes mais comumente usados como marcadores (SOSA *et al*, 2010).

Além disso, pode-se citar também a detecção precisa de mutações no gene através da recombinação homóloga e a maior eficiência das células tronco embrionárias de realizarem esse processo em comparação as demais células (WAKCHAURE *et al*, 2015).

Em relação às desvantagens, a metodologia apresenta limitação de ser aplicada apenas em pequenos roedores, visto que nenhuma linhagem competente

de células tronco embrionárias foi descrita para outra espécie de mamífero, mas ainda são estudados maneiras de estabelecer linhagens de células de ruminantes a partir das experiências e conhecimentos obtidos através do isolamento e manutenção de células humanas (CALIÓ, 2017).

Em contraste com a técnica de microinjeção pró-nuclear, em que diversas cópias de um mesmo fragmento de transgene são inseridas aleatoriamente no genoma, nessa técnica o gene de interesse é modificado em seu local original no cromossomo. Portanto, o nível de expressão do gene alvo que foi modificado terá o mesmo padrão de expressão do gene original.

2.5. TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR LENTIVÍRUS

A metodologia de transferência gênica em embriões mediada por retrovírus teve início baseada nos achados de JAENISCH em 1976. Os lentivírus são membros da família Retroviridae, que são caracterizados pelo uso da transcriptase reversa viral e integrase para inserção estável da informação genômica viral no genoma do hospedeiro (SAKUMA *et al*, 2012).

Existem dois diferentes sistemas de vetores retrovirais: o γ -retroviral, que são vetores derivados de vírus da leucemia murina (MLV) e os vetores Lentivirais (LV) derivados principalmente do vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo esse o mais utilizado hoje pelo fato das partículas Lentivirais serem capazes de promover a integração genômica mesmo em células que não estão se dividindo e realizam essa infecção lentamente, o que torna o processo menos citotóxico e de maior viabilidade para produção *in vitro*. Além disso, seu padrão de integração, diferentemente dos vetores derivados do MLV, tendem a apresentar menor risco em relação à mutação no local de inserção e também são capazes de produzir maior título de vetores quando comparado aos MLV (MERTEN *et al*, 2016).

O HIV tem um genoma de RNA de sentido positivo de cadeia simples de aproximadamente 9 kb de comprimento que codifica nove proteínas virais. Os três maiores janelas de leitura aberta codificam suas três principais proteínas estruturais: *Gag*, *Pol* e *Env*. O gene *gag* codifica proteínas do núcleo viral. O gene *pol* codifica um conjunto de enzimas necessárias para a replicação viral e o *env* codifica a glicoproteína de superfície viral gp160 (TISCORNIA *et al*, 2006).

Os vetores Lentivirais originados do HIV utilizados em pesquisa são da terceira geração e compostos por quatro plasmídeos: um deles composto pelos

genes *gag* e *pol*, responsável pela formação de proteínas estruturais e enzimas virais, outro expressando o gene *rev*, que codifica um regulador pós-transcricional; outro carregando o gene *env* codificando a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-g) do envelope, devido sua estabilidade durante o processamento e seu grande espectro de transdução, e um último plasmídeo consistindo do cassete de expressão do transgene, associado a um promotor heterólogo (SAKUMA *et al*, 2012; MERTEN *et al*, 2016).

Para aumentar a segurança, os vetores de terceira geração também tiveram a região promotora (U3) de 3' LTR removida para adicionar a propriedade SIN (Self inactivating), diminuindo assim o risco de replicação de Lentivirais competentes e diminuindo a interferência do promotor (ESCORS E BRECKPOT, 2010).

Entre as vantagens apresentadas pelo trabalho com Lentivirais pode-se citar a facilidade de execução técnica do sistema, assim como a ocorrência da integração genômica (KAESTNER *et al*, 2015), o que permite a propagação do transgene de forma estável para as gerações subsequentes por longo período e com uma expressão constante, como já foi observado no trabalho de CHANDRASHEKARAN *et al* (2014) em que foi demonstrada a expressão da proteína GFP em uma gama de tecidos murinos por até três gerações. Além disso, o sistema de transfecção mediada por lentivírus também apresenta a vantagem para trabalhar com células eucarióticas, visto que o mecanismo de infecção é lento trazendo menor toxicidade para as células, e também com a nova engenharia utilizada na terceira geração de vetores garante a menor probabilidade de recombinação genética entre os vetores, aumentando maior segurança durante a sua manipulação e aplicação.

Já em relação às desvantagens do sistema, a principal limitação envolve o tamanho limitado do transgene utilizado para inserção, sendo mais indicado trabalhar com tamanhos de até 10kb (CLARK E WHITELOW, 2003; SOSA *et al*, 2010). O tamanho utilizado geralmente é inversamente proporcional à quantidade de transgenes integrados. Outro fator pertinente consiste no fato que a inserção do transgene possa ocorrer apenas em uma parte das células ou tecidos e também a expressão do material genético possa sofrer interferência das sequências virais (WAKCHAURE *et al*, 2015).

2.6. NANOTECNOLOGIA

Um dos principais eixos inseridos recentemente nas atividades de pesquisa é o uso das nanotecnologias, sendo considerada uma promessa para o século XXI com aplicações na indústria de cosméticos, eletrônicos, farmacêutica, médica, agronegócio, despoluição ambiental e outras (AOUADA, 2009). Na nanotecnologia os materiais utilizados apresentam escalas manométricas de 1 a 100 nanômetros, que é considerado o mesmo que um bilionésimo de metro, ou seja, 10^{-9} m (Figura 8) (NEVES, 2013). No entanto, na área farmacêutica e biomédica partículas de até 100nm são considerados nanomateriais (WONG *et al*, 2017).

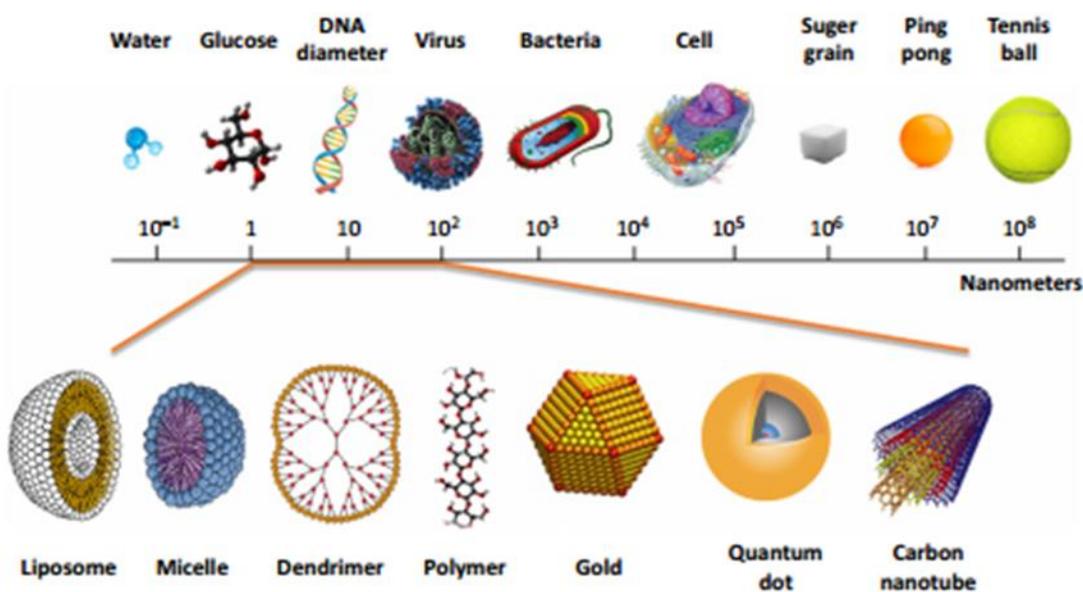


Figura 8: Escala manométrica. Fonte WONG *et al*, 2017.

O termo nanotecnologia surgiu em meados de 1974 essa palavra vem do grego onde nano significa anão fundido com tecnologia. Apesar de estar em seu estágio embrionário vem sendo muito utilizadas por empresas e em pesquisas como mencionado anteriormente (LIMA, 2014).

A nanotecnologia envolve a participação de várias áreas, sendo assim considerada multidisciplinar abrangendo profissionais como físicos químicos, engenheiros e farmacêuticos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Com a nanotecnologia surge um novo nível de domínio da matéria, o que permite criar

novas estruturas organizadas a partir da escala molecular, dotadas de novas propriedades físico-químicas (GALEMBECK; RIPPEL, 2004).

Recentemente países como os Estados Unidos, seguidos da Alemanha e Japão tem investido grandes quantias em dinheiro no desenvolvimento de nanotecnologia com o intuito de fabricar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos baseados na crescente capacidade tecnológica moderna de manipulação atômica e molecular, com destaque para o Japão e os Estados Unidos como líderes no ranking dos investimentos. (PASCHOALINO *et al.*, 2010; NOVAES, 2016).

2.6.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Biopolímeros é o nome dado aos polímeros usados como biomateriais e podem ser de origem natural ou sintética, biodegradáveis ou não. Eles possuem características específicas para aplicações *in vivo*, sendo compatíveis com a diversidade e complexidade destes ambientes. Biopolímeros por serem biomateriais, têm função de interagir com sistemas biológicos para permitir avaliação, tratamento, aumento ou substituição de órgãos ou funções do corpo (GHORMADE *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2011).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 9). Elas se diferenciam quanto a sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas são definidos como sistemas reservatórios, possuem um invólucro polimérico disposto em volta de um núcleo oleoso, sendo possível a identificação de um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido (COSTA, 2013) As nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, e sua matriz é mais homogênea, sistema matricial, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (AZEVEDO, 2003; AOUADA, 2009).

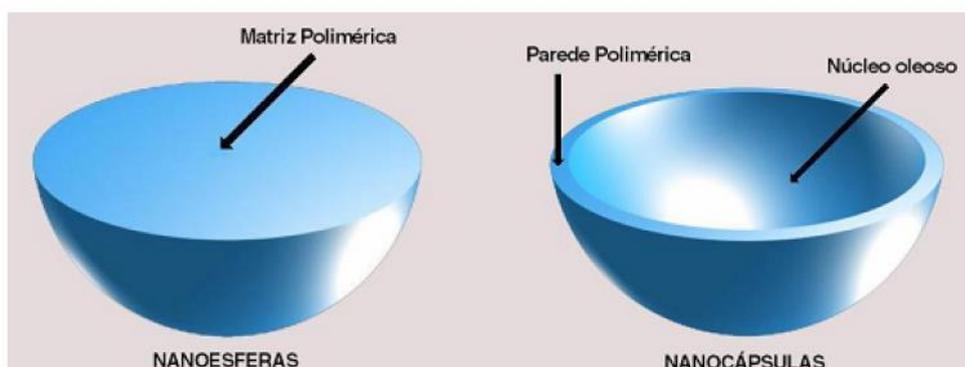


Figura 9: Diferenças entre nanoesferas e nanocápsulas. (AOUADA, 2009).

Para fins de carreadores de moléculas bioativas a utilização de nanopartículas oferece diversas vantagens tais como: proteção do elemento que está sendo carregado, direcionamento a sítios específicos, estabilidade física e biológica suficiente para reter o elemento e promover a liberação controlada, boa tolerabilidade dos componentes, simplicidade do processo de formulação e possibilidade do escalonamento do processo (CERIZE, 2012; ASAI, 2012). Devido a reduzida solubilidade e biodisponibilidade cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas não são aproveitadas. Para solucionar esse problema são utilizados carreadores micrométricos e nanométricos, capazes de modular a liberação com alto grau de reprodutibilidade, sendo uma alternativa altamente eficaz (VILLANOVA *et al.*, 2010). Na área farmacêutica e biomédica, para que seja considerada uma nanopartícula o tamanho da mesma tem que ser menor que 1µm (STAMFORD-ARNAUD, 2012).

Nanocarreadores são nanoestruturas associadas ou envolta a uma substância ativa (nanomedicamento) que possuem diâmetro entre 10 e 800 nm e são capazes de transportar e direcionar este nanomedicamento a um alvo específico do organismo no qual deve agir, executando uma liberação controlada. Esses nanocarreadores podem ser formado por: nanopartículas metálicas; nanopartículas de cerâmica, micelas; vesículas; lipossomos; dendrímeros, nanopartículas virais, conjugados fármaco-polímero; conjugado proteína-polímero, nanotubos de carbono, entre outros (VILLANOVA *et al.*, 2010; CERIZE, 2012).

As NPs poliméricas podem ser obtidas através da síntese de polímeros sintéticos ou naturais. Os poliácridatos e policaprolactona (PCL) são ditos como polímeros sintéticos, já a gelatina, albumina e a quitosana são considerados polímeros naturais (AOUADA, 2009).

Entre as NPs poliméricas, a quitosana é um material que vem se destacando e sendo muito utilizada (DAMIAN *et al.*, 2005; BRUNEL *et al.*, 2009; JONASSEN *et al.*, 2012; BERILLO *et al.*, 2014). Uma grande variedade de métodos de síntese e aplicações de nanopartículas de quitosana é encontrada na literatura sendo a mais utilizada a técnica de gelatificação ionotrópica (BORGES *et al.*, 2007; AJUN *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2009).

2.6.2. QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo natural formada por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, unidas por ligações β -1,4, formando uma longa cadeia linear (CASETTARI *et al.*, 2012; NEVES, 2013; GANGULY *et al.*, 2014), é obtida através da desacetilação da quitina, por isso suas estruturas são bem semelhantes (Figura 10). Para o processo de desacetilação da quitina muitas reações consecutivas são necessárias, por isso, a sua completa desacetilização é pouco frequente. Por isso, a quitosana possui em torno de 50-60% de grau de desacetilação. A diferenciação entre a quitina e a quitosana é fornecida pela solubilidade, já que a quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de vários ácidos (ácido acético e clorídrico são os mais empregados). E a quitina apresenta uma limitada solubilidade (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Esse processo de desacetilação pode ser realizado através de processos químicos ou microbiológicos (utilizando enzimas específicas ou microorganismos) (BLANCO, 2015).

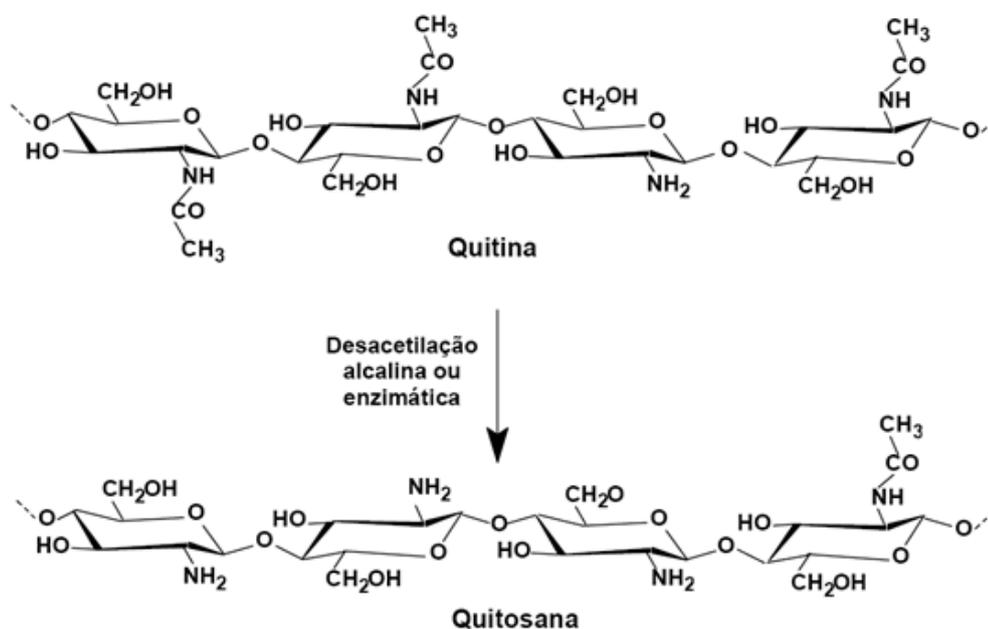


Figura 10: Desacetilação da quitina formação da quitosana. Fonte: OLIVEIRA JUNIOR, 2006.

A quitina é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, (CANELLA; GARCIA, 2001), e é encontrada no exoesqueleto dos crustáceos, insetos, artrópodes e na parede celular de fungos especialmente nas espécies do gênero *Mucor* (DAMIAN; BEIRÃO; TEIXEIRA, 2005). A quitosana e a

quitina por possuírem característica atóxicas, biodegradáveis, biocompatíveis e por serem produzidos por fontes naturais renováveis chamam a atenção dos pesquisadores, com isso suas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase 70 anos (AOUADA,2009).

A quitosana possui algumas propriedades que podem variar amplamente, tais como: pureza, viscosidade, grau de desacetilação, peso molecular e estrutura polimorfa devido às diversas variáveis de processamento, entre elas, temperatura, tempo de reação e composição dos reagentes, influenciando as características do produto final. Preparações comerciais de quitosana têm valores com peso molecular entre 10 a 4 e 10 a 5 Dalton (KUMAR, 2000).

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes da quitosana. Ele determina o conteúdo de grupos amínicos livres no polissacarídeo diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade. Comercialmente as quitosanas disponíveis tem uma média peso molecular variando entre 3800 e 20.000 daltons e 66% a 95% deacetiladas. (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004). Para conhecer o teor de grupos N-desacetilados e, conseqüentemente, de grupos -NH₂ presentes na cadeia polimérica das amostras de quitosana é necessário determinar as propriedades deste polissacarídeo que está fortemente relacionado com este parâmetro. A medida que a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido (-NHCOCH₃) da quitona são transformados, em graus variados, em grupos amino (NH₂), dando origem a quitosana. (GOY, 2004).

A caracterização do grau de desacetilação é fundamental já que permite o uso do biomaterial nas suas várias formas de aplicações como micropartículas, géis, membranas e como veículo de liberação de fármacos (LARANJEIRA; 2009). Algumas técnicas podem ser utilizadas para medir o grau de desacetilação da quitosana, tais como: titulação condutométrica e potenciométrica (LAUS *et al.*, 2010), análise elementar (ANTONINO, 2007), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e de carbono (RMN 13C) (GARCIA *et al.*, 2008), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (ROSA, 2009), cromatografia gasosa (DAMIAN *et al.*, 2005), cromatografia de permeação em gel, titulação potenciométrica (OLIVEIRA JUNIOR, 2006), entre outras.

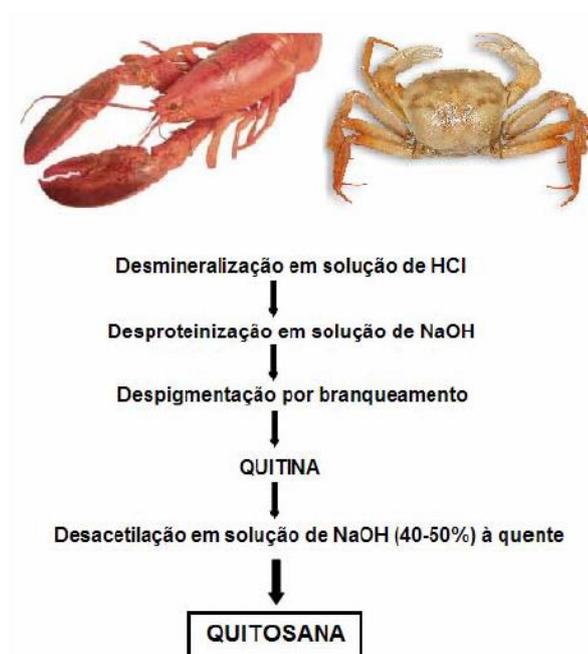


Figura 11: Esquema da obtenção de quitina e quitosana. Fonte: AOUADA, 2009.

Para realizar a caracterização da massa molar da quitosana alguns métodos podem ser empregados como cromatografia de permeação em gel (METHACANON *et al.*, 2003), cromatografia de exclusão por tamanho (NGUYEN *et al.*, 2009) e viscosimetria capilar (CANELLA e GARCIA, 2001). Sendo esta última, uma das técnicas mais empregadas para determinar a massa molar de polímeros em soluções diluídas, pelo fato de ser uma técnica que não exige uma aparelhagem complexa e de alto custo. Esses parâmetros como o grau de desacetilação e o peso molecular influenciam na formação do complexo quitosana/DNA (KÖPING-HÖGGÅRD *et al.*, 2004).

A quitosana apresenta propriedades biológicas que possibilitam sua aplicação nas áreas médicas e farmacêutica como pode ser visto na tabela 1 (XIA *et al.*, 2010).

Tabela 1: Aplicações biomédicas da quitosana.

Campo	Aplicação
Alimentício	Agente antimicrobiano e conservante;
	Aceleração da absorção de Cálcio e Ferro;
	Fibra dietética;
	Redução do colesterol
Farmacêutico e Medicinal	Efeito protetor contra infecções bacterianas;
	Estimulador do Sistema Imune;
	Antitumoral;
	Carreador de drogas e DNA;
	Aceleração da cicatrização;
	Pele artificial;
	Cosmético;
	Suturas cirúrgicas;
	Inibidor de placa dentária;
Antioxidante	

2.6.3. GELIFICAÇÃO IONICA

A quitosana apresenta habilidade de formar sais na presença de ácidos fazendo com que ela seja reativa e solúvel (CAMPOS *et al.* 2004), podendo assim gelatinizar em contato com poliânions específicos, (QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2009; DUDHANI e KOSARAJU *et al.*, 2010). Devido a sua simplicidade a técnica de gelatinização ionotrópica vem sendo muito utilizada na produção de nanopartículas.

O processo consiste na adição dos componentes em temperatura ambiente nas diferentes fases. Neste contexto trata-se de uma fase alcalina (pH 7-9) contendo tripolifosfato (TPP) que é adicionada lentamente em uma fase ácida (pH 4-6) contendo quitosana. As NPs são formadas espontaneamente após a mistura das duas fases através de ligações inter e intramoleculares formadas entre os fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana (Figura 12 e 13) (AOUADA, 2009).



Figura 12: Processo geral de gelificação iônica. Fonte: LIMA, 2013

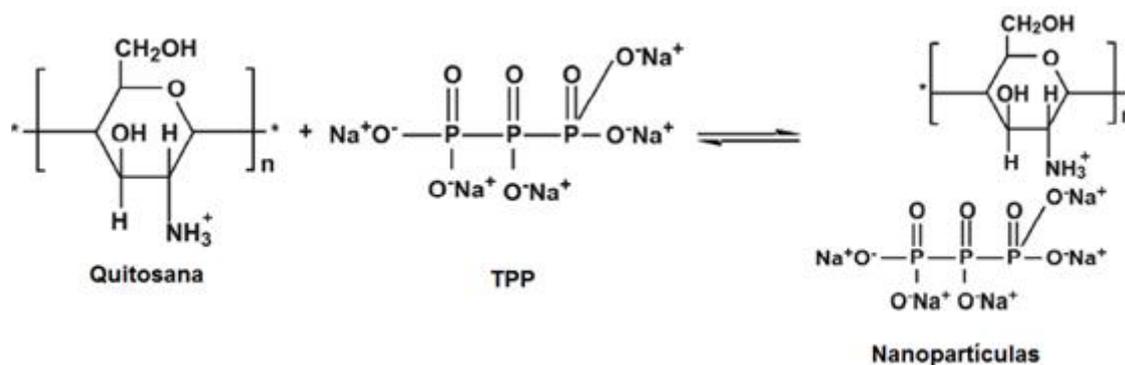


Figura 13: Processo de Gelificação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio. Fonte: NEVES, 2013

O TPP tem a capacidade de formar géis com a interação de suas cargas negativas e a dos grupos aminos da quitosana (Figura 14) e por se um polieletrólito atóxico é usado para a formação da NPs. A densidade de carga da quitosana e do TPP podem ser utilizadas para controlar esta interação, a qual depende principalmente, do pH da solução (BERGER *et al.*, 2004).

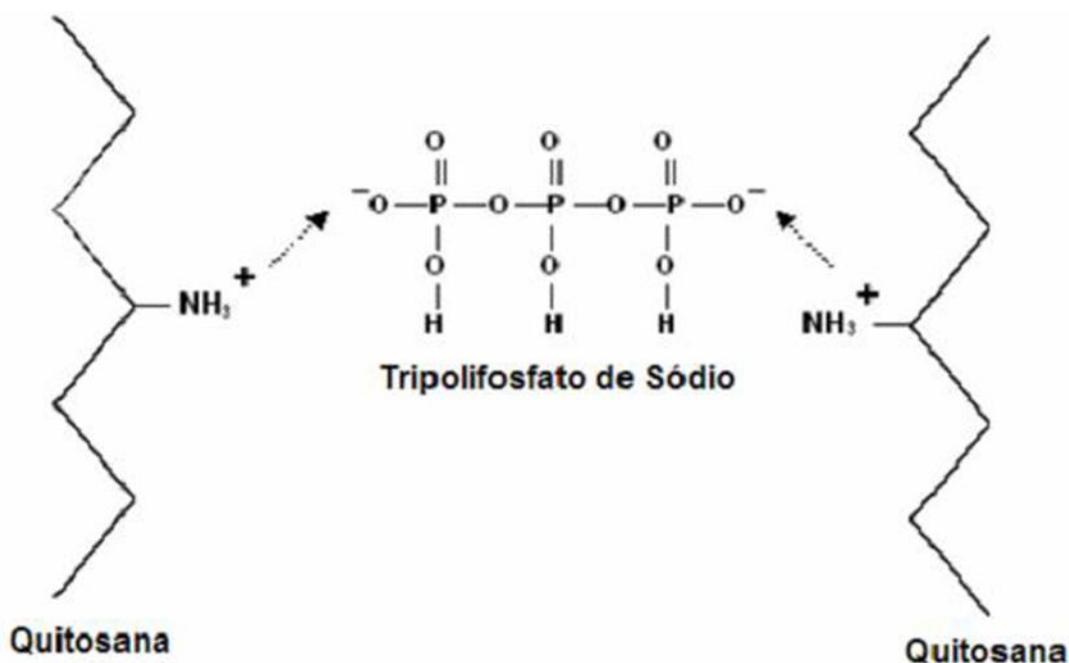


Figura 14: Interação entre as cargas negativas do TPP e a dos grupos aminos da quitosana. Fonte: BERGER *et al.*, 2004

O método de gelificação iônica apresentam vantagens para a obtenção de NPs, tais como: obtenção espontânea das nanopartículas sob condições de controle amenas que não envolvem altas temperaturas, utilização de solventes orgânicos ou técnicas de sonicação e os componentes utilizados são de baixo custo e de fácil acesso (CALVO *et al.*, 1997).

A manipulação e o controle da formação de NPs de quitosana-TPP de alto rendimento com tamanho nanométrico e densidade de carga predeterminada, pode ser obtida através da variação das condições do processo como concentração de quitosana, razão em massa de quitosana e TPP e valores de pH (AOUADA, 2009).

3.6.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS

3.6.4.1. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS), é uma técnica baseada no movimento Browniano e no efeito Doppler induzido por um feixe de laser, que permite determinar o tamanho, distribuição de tamanho e forma das partículas em suspensão (BABICK, *et. al.*, 2012; LIU, *et. al.*, 2015). Um laser monocromático inside

sobre uma suspensão de partículas em movimento browniano, isso faz com que as partículas fiquem excitadas criando uma mudança Doppler (diferença da luz difusa com a luz não difundida), fornecendo informações sobre o tamanho, a distribuição, a forma e a estrutura das partículas. O movimento browniano é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, quanto maior o diâmetro da partícula menor será o movimento browniano (CUMMINS,KNABLE,YEH,1964; WEBER e SCHWEIGER, 1998).

O Potencial Zeta está relacionado com as cargas presentes na superfície das partículas denominado potencial elétrico, sendo calculado pela medida do potencial elétrico aplicado na superfície de cisalhamento. Essa superfície está relacionada ao fato de que quando as partículas estão em um meio aquoso possuem uma carga superficial que forma uma camada diferente do meio dispersante, e ao se movimentarem (movimento browniano) os íons próximos a sua superfície dentro do limite da camada se movem juntamente com a partícula. Contudo, os íons que estão fora dessa camada não irão se mover com a partícula, originando a denominada superfície de plano hidrodinâmico de cisalhamento (MORAES, 2009; PAPINI, 2003) (Figura 15).

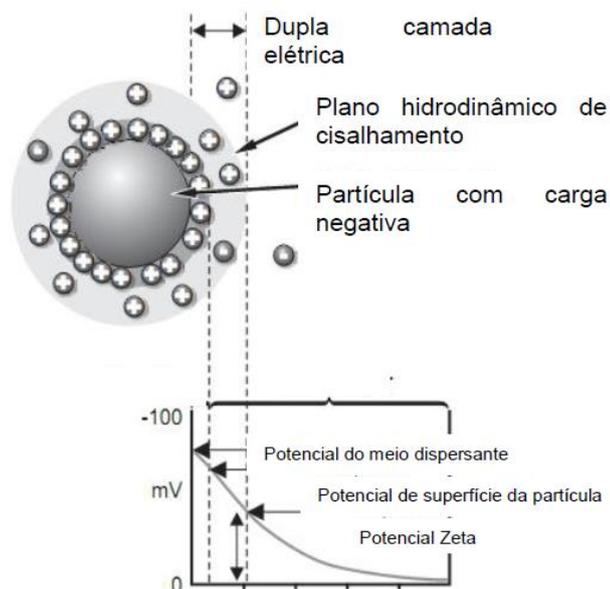


Figura 15: Potencial Zeta. Fonte: Zeta Potential Overview, da empresa Brookhaven Instruments

3.6.4.2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

O Microscópio de Força Atômica surgiu para suprir as barreiras do microscópios de varredura por sonda (STM) quanto à condutividade das amostras que podem ser analisadas. A Microscopia de Força Atômica tem como princípio fornecer imagens de pequenas áreas, da ordem de 5 nm² mostrando-se apenas 40 ou 50 átomos, ou ainda, imagens com 100 μm² ou maiores podem ser medidas, mostrando-se as formas de dúzias de células vivas ao mesmo tempo, é possível estudar também todo o tipo de material isolante, já que este não utiliza corrente de tunelamento, mas forças de interação atômica, para produzir imagens microscópios de varredura por sonda (PINTO *et al.*,2013).

AFM é uma técnica que apresenta diversas vantagens tais como: alta resolução, imagens em 3 dimensões, sem a utilização de material condutor para recobrir a amostra, fácil preparação da amostra, possibilita a quantificação direta da rugosidade da amostra, permite a medida da espessura de filmes ultrafinos sobre substratos e análise por fractal. É possível fazer imagens da superfície imersa em líquidos etc. Para a determinação e fornecimento novos materiais essas vantagens que a AFM são extremamente importantes para áreas como a Ciência dos Materiais e a Engenharia dos Materiais entre outras (NUNES,2017).

A técnica da AFM consiste na aproximação da ponta sobre a amostra (a uma distância da ordem de alguns angstroms), ocorre a interação primeiro átomos da ponta com os átomos que compõe a superfície da amostra. Durante a varredura, a haste sofre deflexões por causa da interação atômica, desviando o laser que incide sobre ele (Figura 16). O laser é detectado por um fotodiodo que envia essas informações de desvio da haste para o controle de realimentação que ajusta a posição da amostra (e/ou da ponteira) e para o computador onde é construída a topografia digitalizada da superfície da amostra (HAUGSTAD, 2012).

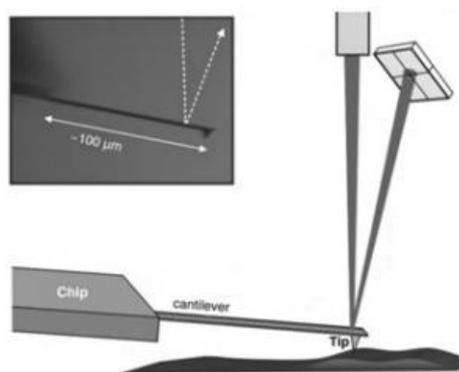


Figura 16: Ilustração princípio do funcionamento do AFM. Fonte: HAUGSTAD, 2012.

3.6.5. NANOTOXIDADE

A nanotoxicologia é um ramo emergente da nanotecnologia e da toxicologia, conhecida como a ciência que estuda os efeitos de nanomateriais em organismos vivos, e a elucidação da relação entre as propriedades físico-químicas (como o tamanho, a forma, o revestimento, a composição e a agregação) de nanopartículas e a sua toxicidade (FISCHER; CHAN, 2007).

O aumento do uso de NPs para aplicações industriais e biomédicas, bem como em produtos de consumo, resultou em sérias preocupações quanto à sua segurança para saúde humana e meio ambiente. Como há a possibilidade das NPs penetrarem em tecidos, células e organelas, devido ao seu tamanho reduzido, estes materiais podem causar efeitos indesejáveis na saúde. Em particular, os nanomateriais podem afetar negativamente as partes suscetíveis da população, contaminar o meio ambiente, resultando em consequências deletérias imprevistas. Contudo essa interação não é indiscriminada, pois depende das propriedades físico-químicas das NPs bem como da identidade de moléculas funcionais presentes na sua superfície. Com isso cria-se um grande interesse em compreender os mecanismos que revelam o comportamento e o destino (biodistribuição) das NPs após introdução no organismo humano, para assim desenvolver nanossistemas adequados para veículo de fármacos e prevenir potenciais efeitos tóxicos (FADEEL; BENNETT, 2010).

As NPs podem ser absorvidas pelo corpo através da inalação, ingestão ou através de penetração dérmica e as diferenças nas propriedades físico-químicas entre NPs e partículas maiores determinam seu comportamento como aerossol, sua

biodistribuição no corpo após a translocação do portal de entrada, suas interações celulares e seus efeitos, conforme indicado na Tabela 2 (OBERDORSTER, 2009) .

Tabela 2: Nanopartículas versus partículas maiores: características, biocinética e efeitos (trato respiratório como portal de entrada). Fonte: OBERDORSTER, 2009

	<i>Nanopartículas (<100 nm)</i>	<i>Partículas maiores (> 500 nm)</i>
<i>Características gerais</i>		
<i>Ratio: número / área de superfície por volume</i>	Alto	Baixo
<i>Aglomerção no ar, líquidos</i>	Provável (dependente do meio: superfície)	Menos provável
<i>Deposição no tracto respiratório</i>	Difusão: durante trato respiratorio	Sedimentação, impactação, interceptação; ao longo do trato respiratorio.
<i>Adsorção de proteínas lipídios / in vitro.</i>	Sim; importante para biocinética	Menos eficaz
<i>Translocação de órgãos-alvo secundários</i>	Sim	Geralmente não (para fígado sob 'sobrecarregado')
<i>Autorização</i>	Sim	Geralmente não (para fígado sob 'sobrecarregado')
<i>Mucociliar</i>	Provavelmente sim	Eficiente
<i>ALV. macrófagos</i>	Pobre	Eficiente
<i>Células epiteliais</i>	Sim	Principalmente sob sobrecarga
<i>Circulação linfática</i>	Sim	Sob sobrecarga
<i>Circulação sanguínea</i>	Sim	Sob sobrecarga
<i>Neurônios sensoriais (absorção + transporte)</i>	Sim	Não
<i>Adsorção de proteínas lipídios/in vivo</i>	Sim	Alguns
<i>Captação de/de entrada de célula</i>	Sim (caveolae Clatrina lábio. jangadas; difusão)	Principalmente células fagocíticas
<i>Mitocôndrias</i>	Sim	Não
<i>Núcleo</i>	Sim (<40 nm)	Não
<i>Efeitos directos (ressalva: química e</i>		

<i>dose!)</i>		
<i>Em órgãos-alvo secundários</i>	Sim	Sim
<i>No portal de entrada (tracto resp.)</i>	Sim	Sim
<i>Inflamação</i>	Sim	Sim
<i>Stress oxidativo</i>	Sim	Sim
<i>Ativação de vias de sinalização</i>	Sim	Sim
<i>Genotoxicidade primária</i>	Alguns	Não
<i>Carcinogenicidade</i>	Sim	Sim

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar NPs de quitosana carreando DNA plasmidial portando gene repórter GFP como método alternativo de transfecção de células somáticas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a síntese de NPs de quitosana;
- Caracterizar o tamanho e o potencial Zeta das NPs de quitosana;
- Avaliar a complexação das moléculas de DNA plasmidial às NPs de quitosana;
- Investigar a capacidade das NPs de quitosana atuarem como carreadores na transfecção de DNA plasmidial em células humanas (HEK293-Human Embryonic Kidney 293 cells);
- Avaliar a citotoxicidade do nanosistema (DNA plasmidial complexado às NPs de quitosana), em células HEK 293.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DENILEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado na Embrapa Gado de Leite no laboratório de Reprodução Animal e no laboratório de Nanotecnologia, constituídos de quatro etapas principais como mostra a figura 17.

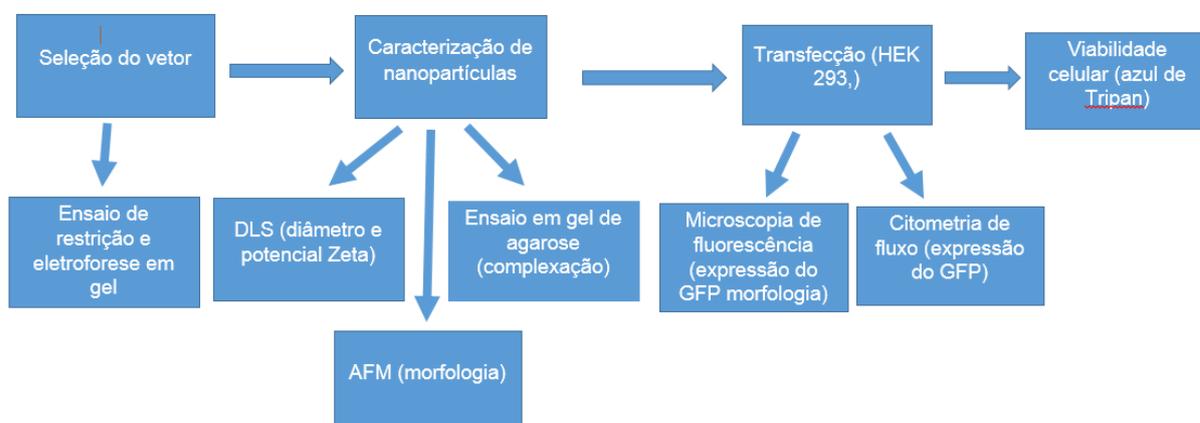


Figura 17: Desenho geral dos estudos de transfecção gênica utilizando nanopartículas de quitosana em diferentes modelos biológicos > HEK 293.

4.2. CLONAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Primeiramente foram selecionados alguns plasmídeos que foram disponibilizados pelo laboratório de Reprodução animal da Embrapa Gado de Leite, em seguida foram submetidos ao ensaio de eletroforese em gel de agarose utilizando 2µl do tampão de carregamento (*Loading dey*, Promega) 1µl do padrão composto de fragmentos de DNA conhecidos (1kb plus, Invitrogen), 1µl da amostra

contendo o plasmídeo. Os plasmídeos utilizados foram os seguintes: PEF-GFP, PSZ-GREEN, PAC-GFP, PGK-GFP, PCMV-GFP e PLL, 3.7 (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos plasmídeos utilizados, quanto a seu tamanho, proteína que expressa e enzima de restrição.

Plasmídeo	Proteína	Enzima de restrição	Tamanho
PEF-GFP	GFP	Not I	5051 bp
PSZ-GREEN	szGREEN	Not I	3330 bp
PAC-GFP	GFP	XbaI	5400 pb
PGK-GFP	GFP	XhoI	7486 bp
PCMV-GFP	GFP	Not 1	4479 bp
PLL 3.7	GFP	Not I	7649 bp

A clonagem foi realizada utilizando uma estirpe de *E. coli* Stbl3 e sua transformação com os plasmídeos foram realizadas segundo o método de choque térmico (FURLANETO, 2006). A eficiência da transformação foi avaliada usando o Kit Invitrogen™ One Shot™ Stbl3™, segundo recomendações dos fabricantes. As bactérias foram descongeladas em gelo, em seguida, adicionou-se 5µl (100 ng) do plasmídeo em um frasco contendo a solução de bactéria. Após 30 minutos, a bactéria foi submetida ao choque-térmico a 42°C por 45 segundos e mantida em gelo durante 2 minutos. Posteriormente, o meio de transformação foi adicionado e as bactérias foram mantidas a 37°C no shaker por uma hora. Na sequência, as

bactérias foram cultivada sem placas em meio LB ágar (Luria Bertani). As placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Então, uma colônia isolada foi selecionada e transferida para o meio LB que foi incubado a 37°C no shaker *overnight*. Uma alíquota da bactéria foi congelada a – 80°C e a outra foi usada para a extração do plasmídeo.

A extração do DNA foi realizado seguindo o protocolo do kit QIAprep® Spin Maxprep, de acordo com as recomendações do fabricante. O sedimento de DNA obtido foi resuspenso em TE (Tris-EDTA) - pH 8,0, e armazenado em -20°C até o uso. Foram feitas alíquotas de 1µl para a quantificação no Espectrofotômetro (Nanodrop).

A análise da integridade e grau de pureza do plasmídeo selecionado, foi feita através da eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) utilizando o ensaio de restrição com a enzima Not 1 (Jene bioscience).

4.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As NPs livres foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica (CALVO *et al.*, 1997), baseado na interação eletrostática entre grupamentos amino catiônicos da quitosana (cátion NH₃⁺) e os fosfatos do TPP, carregados negativamente permitindo assim a formação de nanopartículas esféricas (FAN *et al.*, 2012).

Os materiais e reagentes utilizados foram quitosana de baixo peso molecular (50.000 – 190.000 Da), com grau de desacetilação 75-85% (Sigma-Aldrich), ácido acético (Sigma-Aldrich) e tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich).

Primeiramente foi preparado 30 ml de solução de quitosana (SIGMA 48869-250g) constituída de 0,062g de quitosana dispersa em 600 µl de ácido acético 2% e 29,4ml de água ultra pura (MiliQ). A quitosana foi solubilizada durante 24 horas em agitação moderada. Após esse período, o pH da solução foi ajustado para 4 utilizando-se solução estéril de NaOH (5M).

Uma segunda solução foi preparada com TPP (1 mg/mL) em 15 mL de água ultra pura (MilliQ). A solução foi mantida em constante agitação durante 30 minutos.

Para a formação das NPs, o procedimento foi baseado em manter a solução de quitosana em constante agitação magnética durante todo o processo de gotejamento da solução de TPP utilizando uma seringa estéril de 10 mL, acoplada a haste do agitador magnético a uma distância de aproximadamente 14 cm. Após o gotejamento a solução foi mantida sob agitação constante por 30 minutos. Houve variação na proporção de solução de quitosana e TPP para encontrar a melhor relação dos reagentes para produção de uma nanopartícula estável.

Os nanocomplexos contendo NP de quitosana e DNA plasmidial foram preparados de duas maneiras: (i) Foram utilizados 6 ml da solução de quitosana em constante agitação durante o gotejamento simultâneo de 1 ml da solução de TPP e 1ml da solução de plasmídeo. (ii) Foram utilizados 6 ml da solução de quitosana em constante agitação durante o gotejamento de 1ml da solução de plasmídeo. A solução de DNA plasmidial foi preparada diluindo 160 µg do plasmídeo em 840 µl de água ultrapura.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E NANOCOMPLEXOS

As NPs livres e os nanocomplexos contendo DNA plasmidial foram caracterizadas quanto ao tamanho e índice de polidispersão através de espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico (DLS), e potencial Zeta pelo método de mobilidade eletroforética, com a utilização do equipamento Zetasizer® (Nano-ZS da Malvern). Foram analisadas amostras diluídas em água, em DMEM e DMEM com soro fetal bovino. As leituras foram realizadas em triplicata, no Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal, da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG.

A análise de complexação dos plasmídeos às NPs foi feita pela técnica de retardo em gel de eletroforese à 1%. Foram preparadas três amostras: (i) 0,5 µl (1500 ng/µl) do plasmídeo, tampão de carregamento e água, (ii) 0,7 µl (1500 ng/µl) do plasmídeo, tampão de carregamento e água (iii) 10 µl (16 µg/8ml) nanocomplexo. A corrida em gel de eletroforese foi realizada por 2 horas a 80 W.

As imagens do AFM foram gravadas no modo de toque em um Nanosurf *easyScan 2* (Nanosurf Instruments) no ar. As amplitudes de oscilação livres do cantilever foram tipicamente 50 mV para o nano livre ou 90 mV para o nano comp. e o tamanho de varrimento da sonda de microscópio foi 10x10 µm e 20x20 µm. A

resolução do AFM foi de 512x512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram de 225 nm e <10 nm, respectivamente. Uma gota da suspensão de nanopartículas foi colocada sobre uma mica. Em seguida, a amostra foi desidratada sob atmosfera de nitrogênio.

Foram avaliados também a estabilidade dos nanocomplexos por meio de análises no DLS e gel de agarose durante o 1º, 8º, 16º e 24º dias.

4.5. CULTURA DE CÉLULAS HEK 293

Foram utilizadas as células de linhagem Hek 293. As células foram adquiridas do Banco de Células do Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite e cultivadas em incubadoras com atmosfera húmida e com pressão de CO₂ de 5%, em garrafas para cultura (T25 cm²) com meio DMEM, suplementado com 2mM L-glutamina, 1% de penicilina e 10% de soro fetal bovino.

4.6. ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO *IN VITRO*

4.6.1. PRIMEIRO ENSAIO (TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS HEK 293)

A transfeção das células HEK 293 foi realizada em placas de 24 poços, com densidade de 2×10^6 células por poço contendo 500µl de meio, cada tratamento estava em duplicata em cada placa.

Os tratamentos tiveram variação de tempo de exposição das células ao nanocomplexo (3, 6 e 24 horas), tanto para a utilização de nanopartículas sintetizadas com e sem TPP, quanto para a utilização de meio com soro fetal bovino e sem soro fetal bovino (Figura 18). Foram adicionados 25 µl dos complexos em cada tratamento nos poços contendo as células. O controle positivo utilizado foi o reagente FUGENE HD (Promega). O pH do meio foi aferido antes e depois da transfeção. Após um período de 24 e 28 horas as células foram visualizadas no microscópio de fluorescência e avaliadas em citômetro de fluxo utilizando o filtro. As células transfectadas expressando GFP emitiram fluorescência a 509 nm que foram captadas pelo filtro FL1 (fluorescência verde - 530/30 nm) do citômetro de fluxo. A porcentagem de células expressando a proteína exógena foram determinadas com o auxílio do *software* BD FACS Suite.

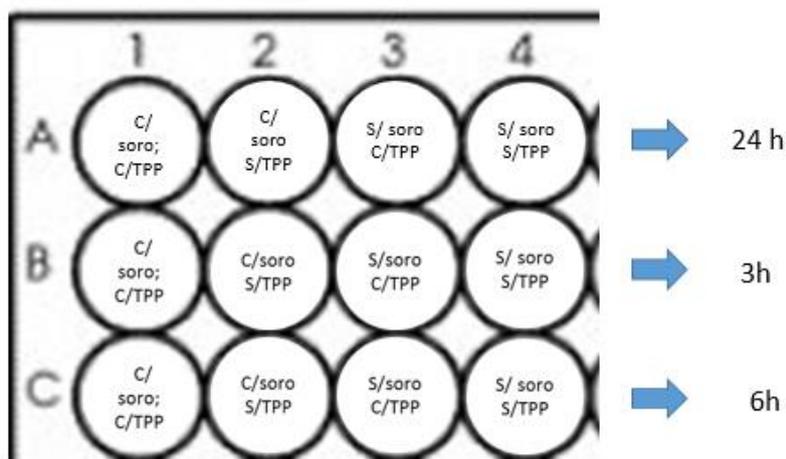


Figura 18: Primeiro ensaio de transfecção composto pelos tratamentos variando tempo de 24, 3 e 6 horas, presença e ausência de TPP, e de SFB.

4.6.2. SEGUNDO ENSAIO (TRANSFECÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE PH EM CÉLULAS HEK 293).

Primeiramente foi realizado diferentes proporções do nanocomplexo com meio DMEM, mantendo a proporção de 1 ml dos nanocomplexos e variando a quantidade de DMEM e em seguida aferiu o pH de cada proporção. Posteriormente foi realizado a transfecção em células HEK 293 placas de 6 poços e foi colocado 1ml das proporções nos diferentes poços. As células ficaram expostas aos nanocomplexos durante 3 horas e o meio foi substituído por meio completo sem os nanocomplexos. Aferiu o pH do meio que retirou dos poços após a transfecção. Após 24h as células foram observadas no microscópio de fluorescência.

Um outro estudo foi realizado utilizando PBS com 10% de SFB e os nanocomplexos nas transecções. Para ajustar o pH utilizou um sal básico encontrado na formulação do PBS, fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em uma concentração de 358,14 g/mol. Os tratamentos nesse ensaio foram: 150 μl do nanocomplexos em 3 ml de PBS/SFB sem ajustar o pH (4,7), 150 μl do nanocomplexos em 3 ml de PBS/SFB com pH ajustado para 6, 6,5 e 7 e o controle positivo utilizado foi o reagente FUGENE HD (Promega). A transfecção foi realizada em placas de 24 poços, com densidade de 2×10^6 células por poço (HEK-293) contendo 500 μl da solução de PBS/SFB com os nanocomplexos nos diferentes pH, cada tratamento estava em duplicata em cada placa. Após 24h as células foram analisadas no microscópio de fluorescência e no citômetro de fluxo. Foram utilizadas

uma 1ml solução PBS/SFP/nanocomplexos para analisar o potencial Zeta nos diferente pH.

5.6.3. TERCEIRO ENSAIO (TRANSFEÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES PH EM CÉLULAS HEK-293).

O terceiro ensaio foi realizado de acordo com o item 3.4.2, porém foi acrescentado um tratamento em que as NPs de quitosana foram mantidas em pH 6,5 com a concentração de nanocomplexos em dobro da utilizadas nos demais tratamentos (3 ml/ 300 µl), alterando a exposição aos nanocomplexos em todos os tratamentos por 24 horas e eliminando o tratamento com pH 6.

5. RESULTADOS

5.1. CLONAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

No teste preliminar para escolha do plasmídeo, foram avaliados e testados 6 plasmídeos pelo método de eletroforese em gel de agarose, onde observou-se que quatro dos plasmídeos (PSZ- GREEN, PAC-GFP, PGK-GFP e PLL3.7) não estavam purificado devido presença de bandas inespecíficas (Figura 19). Somente os plasmídeos PEF-GFP e PCMV-GFP apresentaram pureza adequada. Esses plasmídeos foram analisado no espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) como mostra a tabela 4. O plasmídeo selecionado para o presente estudo foi o PEF-GFP que apresenta o gene que codifica a proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP) sob o controle do promotor EF1a (Figura 20).

Tabela 4: Análise espectrométrica dos plasmídeos PEF-GFP e PCMV-GFP.

Plasmídeo	260/280	260/230	ng/µl
PEF-GFP	1,91	2,24	613,2
PCMV-GFP	1,90	2,51	410,7

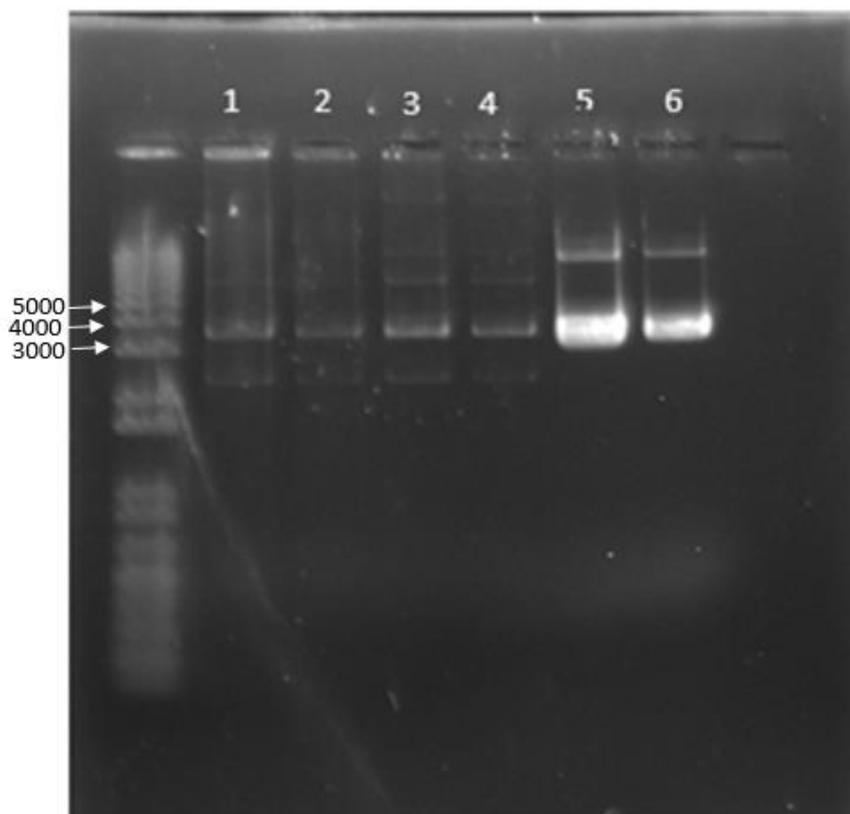


Figura 19: Ensaio de eletroforese em gel dos plasmídeos selecionados para testar a integridade de cada um deles. Os plasmídeos selecionados foram: PSZ-GREEN (1), PAC-GFP(2), PGK-GFP(3), e PLL, 3.7 (4), PEF-GFP(5) e PCMV-GFP(6).

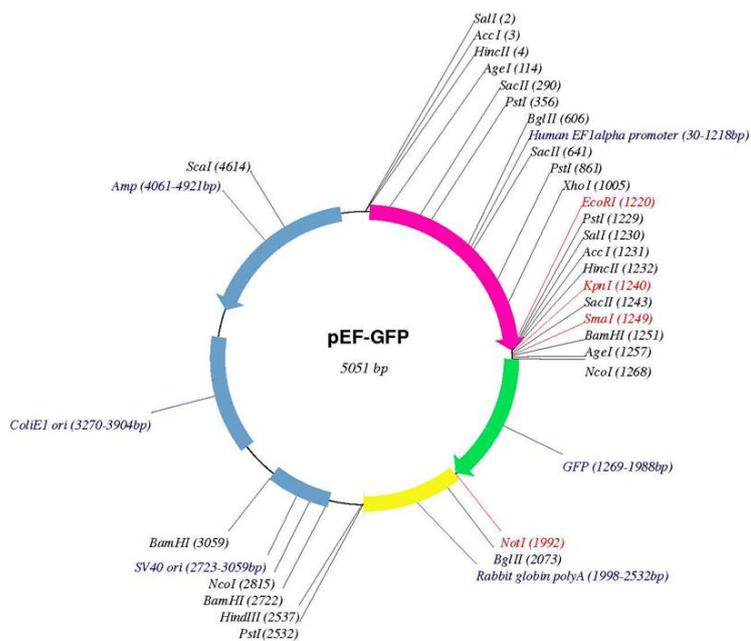


Figura 20: Mapa do vetor plasmidial PEF- GFP, usado no estudo.

Após o ensaio com a enzima de restrição *Not* 1, verificou-se por meio do gel de agarose a 1% que o plasmídeo apresentou tamanho e pureza adequados (Figura 21), concluindo que a clonagem foi obtida com sucesso.

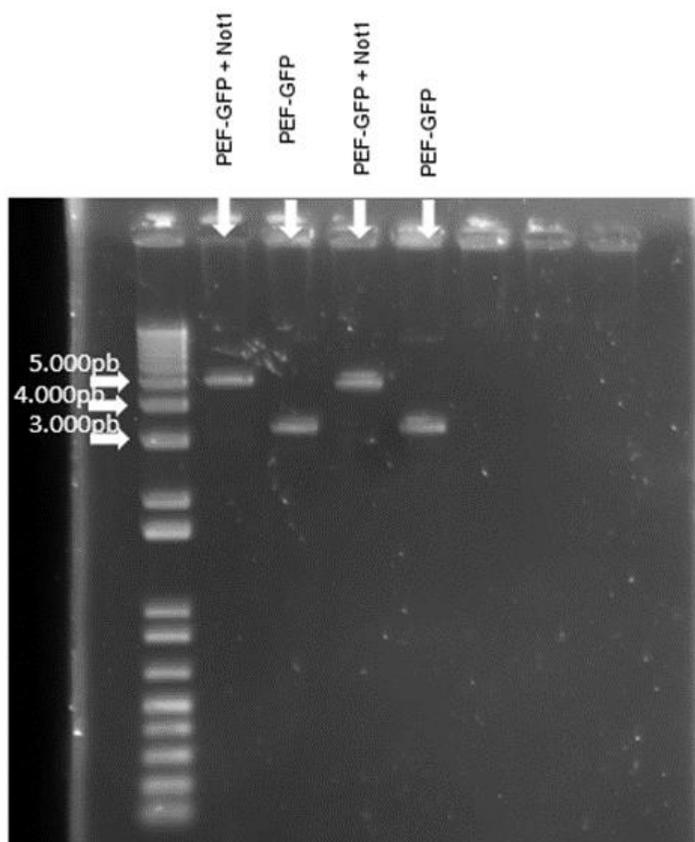


Figura 21: Ensaio de restrição utilizando a enzima *Not* 1 para avaliar a integridade do plasmídeo PEF-GFP por ensaio de eletroforese em gel agarose a 1%.

5.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs sintetizadas foram analisadas quanto a seu diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta utilizando-se o equipamento Zetasizer®, Nano-ZS da Malvern.

Ao realizar a síntese de NPs de quitosana livres, variou-se as proporções de solução de quitosana e TPP que foram analisadas quanto ao diâmetro médio, o PDI e o potencial Zeta, pelo DLS, como mostrado pela Tabela 5.

Tabela 5: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livres em diferentes proporções.

Proporções	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)
Q: 6ml/ T: 2ml	124,7	0,3	28,4
Q: 10ml/ T: 6ml	127,7	0,3	48,4
Q: 12ml/ T: 3ml	130,5	0,4	45,9
Q: 15ml/ T: 3ml	130,6	0,4	46,9
Q: 15ml/ T: 6mL	135,5	0,4	42,9
Q: 15ml/ T: 6ml	117,7	0,4	32,2
Q:15ml/ T: 10ml	313,9	0,4	25,1

Legenda da tabela: Q: solução de quitosana (2,06 mg/ml) e T: solução de TPP (1 mg/ml) em H₂O

As NPs de quitosana complexadas com o plasmídeo PEF-GFP foram preparadas utilizando-se somente a solução de quitosana e a solução contendo o plasmídeo. Foram feitas análises no DLS e obtidos os seguintes resultados demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas de quitosana livres e complexadas com TPP e sem TPP na proporção de 6:1:1.

Amostra	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)	Proporções de solução de quitosana/ TPP/ plasmídeos (ml)
NANO. LIVRE	142,7	0,7	28,4	6/2
NANO. COMP C/ TPP	387,2	0,5	9,04	6/1/1
NANO. COMP. S/TPP	351,9	0,7	9,04	6/1/1
NANO. LIVRE	124,7	0,3	28,4	6/2
NANO. COMP. C/ TPP	284,4	0,6	27,5	6/1/1
NANO. COMP. S/TPP	369,7	0,5	27,5	6/1/1

Legenda da tabela: solução de quitosana (2,06 mg/ml), solução de TPP (1 mg/ml) e solução do plasmídeo (160 µg/µl)

A Tabela 7 mostra o comportamento das NPs complexadas com DNA plasmidial em meio DMEM com soro e sem soro, quanto ao diâmetro médio, PDI e potencial Zeta.

Tabela 7: Valores de diâmetro médio, PDI e Potencial Zeta das nanopartículas complexadas em meio DMEM com soro e sem soro.

Amostra	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)	Proporções de solução de quitosana/ TPP/ plasmídeos (ml)	Dispersante
NANO COMP C/TPP	828,1	0,5	-1,06	6/1/1	DMEM
NANO COMP S/ TPP	2036	0,6	-2,68	6/1/1	DMEM
NANO COMP S/TPP	2279	0,2	-3,64	6/1/1	DMEM + SORO
NANO COMP C/ TPP	61,69	0,8	-4,74	6/1/1	DMEM + SORO

A morfologia das NPs foram avaliadas utilizando o AFM. De acordo com as Figura 24, pode-se observar que a adição do plasmídeo ao sistema provocou um crescimento destas esferas, levando a formação de nanopartículas de quitosana composta com tamanhos que variaram entre 209 a 329 nm (Figura 22).

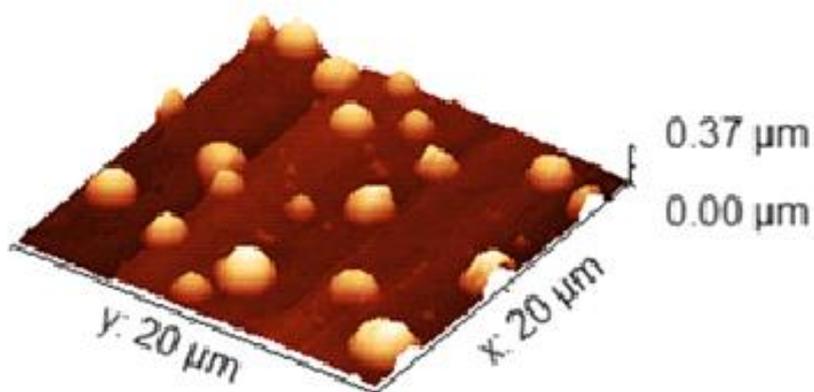


Figura 22: Imagem 3D obtida Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de quitosana complexadas com O plasmídeo PEF-GFP que provocou um crescimento destas esferas composta com tamanhos que variam entre 209 a 329 nm.

Na Figura 23 pode-se observar os resultados da complexação do DNA às NPs. Os números 1 e 2 representam o plasmídeo livre na concentração de 0,5 μ l e 0,7 μ l respectivamente. E o número 3 representa a NP de quitosana complexada com o plasmídeo.

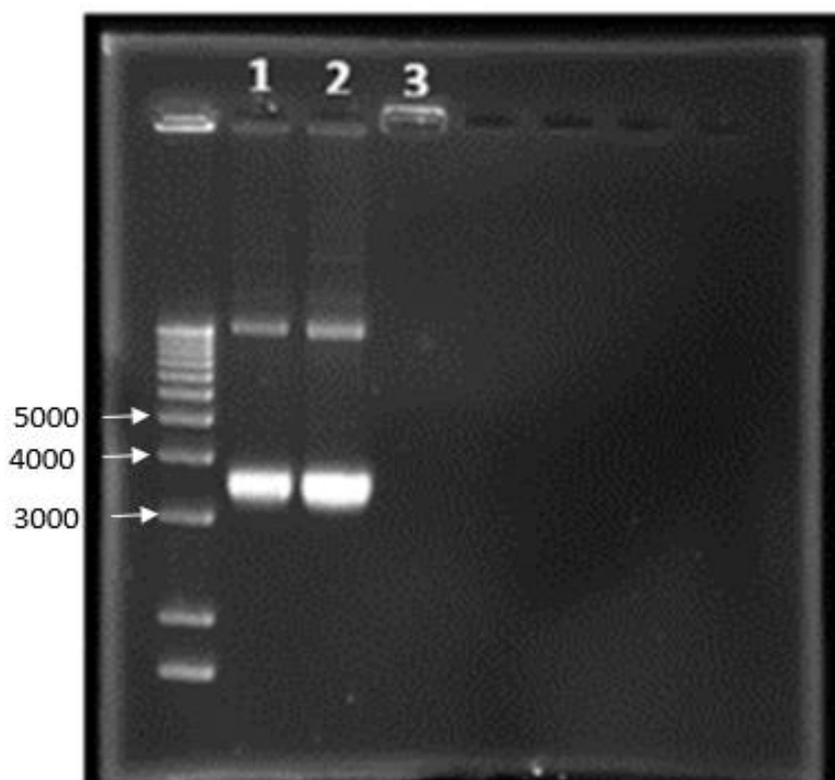


Figura 23: Corrida em agarose, avaliação da incorporação de plasmídeo à nanopartícula de quitosana. 1 e 2 representam o plasmídeo livre na concentração de 1500 ng/ μ l e o número 3 representa a NP de quitosana complexada com o plasmídeo na concentração de 160 μ g/ml.

A estabilidade das NPs livres e complexadas ao DNA plasmidial foram estudadas através de análises no DLS nos 1º, 8º e 16º dias, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Ensaio de estabilidade das nanopartículas, analisadas no DLS.

DIA	NOME	SIZE	PDI	ZETA
1	NANO L	150,5	0,6	+39,6
1	NANO C	331,7	0,7	+34,4
8	NANO L	160,7	0,6	+39,5
8	NANO C	319,5	0,6	+44,1
16	NANO L	171,6	0,6	+28,7
16	NANO C	267,1	0,7	+19,2

Foram realizadas análises estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Não houve diferença significativa quanto ao diâmetro médio dos nanocomplexos entre os dias 1 a 16 ($P > 0,05$; Figura 24) e quanto ao potencial Zeta houve diferenças significativas entre os dias 1 e o 16 ($P < 0,0014$) e também entre o dia 8 e 16 ($P < 0,0014$) (Figura 25).

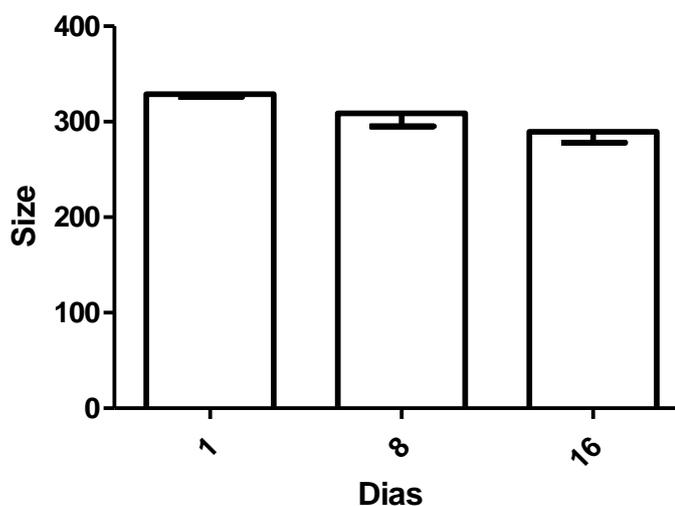


Figura 24: Análise do diâmetro média dos nanocomplexos durante os dias 1, 8 e 16. Não houve diferença significativas entre os tratamentos.

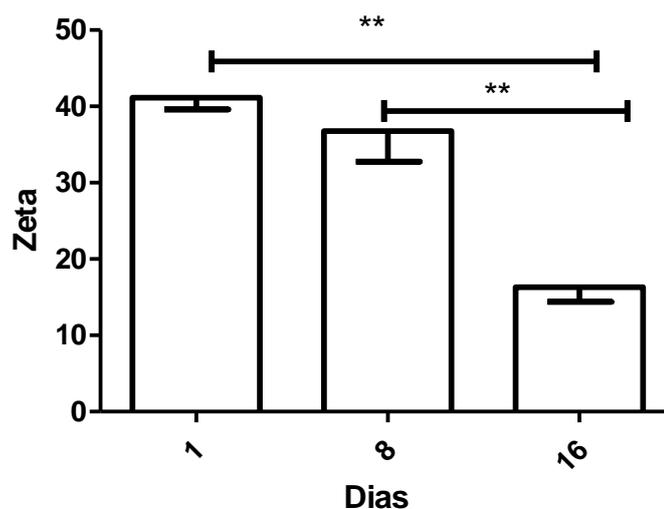


Figura 25: Análise do potencial Zeta dos nanocomplexos durante os dias 1, 8 e 16. Houve diferença significativa entre os dias 1/8 e 8/16. Diferenças significativas entre os tratamentos indicados por ** $P < 0,0014$.

Adicionalmente, foi realizado o ensaio de eletroforese em gel para avaliação da estabilidade dos complexos (Figura 26). Foram utilizados 10 μ l de NPs de quitosana livres, mais 2 μ l do tampão de carregamento (1), 10 μ l (160 μ g/ml) do nanocomplexo mais 2 μ l do tampão de carregamento (2) e 10 μ l (20 ng/ μ l) do plasmídeo PEF-GFP. Como observado na figura no poço 2 não houve migração do plasmídeo pelo gel como no poço 3, isso indica que o nanocomplexo se manteve estável durante os 16 dias de armazenamento..

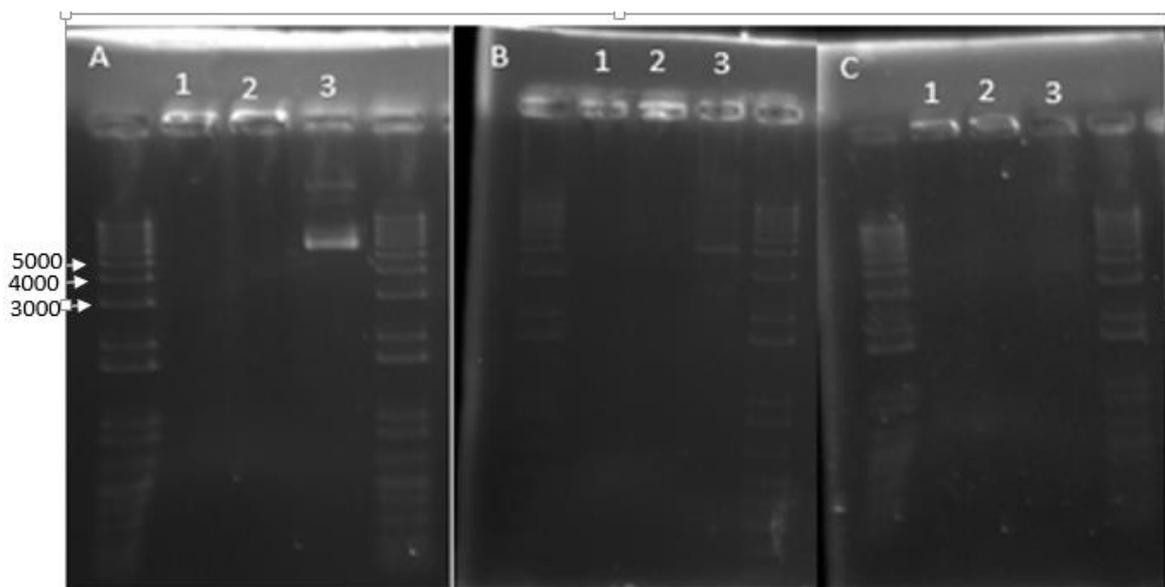


Figura 26: Ensaio de eletroforese em gel de NPs de quitosana livre (1), nanocomplexos (2) e plasmídeo livre (3), para verificar a estabilidade do nanocomplexo nos dia 1°(A), 8° (B) e 16° (C).

5.3. ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO *IN VITRO*

Após os ensaios pilotos de transfecção de DNA plasmidial utilizando NP de quitosana em pH 7,4, as células foram analisados no microscópio de fluorescência e no citômetro de fluxo. Contudo, não foi observada a expressão de GFP.

Nimesh, *et al.*, 2010 descreveu uma taxa de eficiência de transfecção no pH 6,5 de 26, 3% e uma taxa menor de eficiência no pH 7,1 e 7.4 de 9,2 e 0,2 % respectivamente. Com base nessa informação foi realizado um novo ensaio de transfecção testando diferentes proporções de nanocomplexos/DMEM (Figura 27), observou-se que houve um baixa expressão do GFP (Figura 28). Adicionalmente foi observado alteração do pH após a transfecção (Tabela 9).

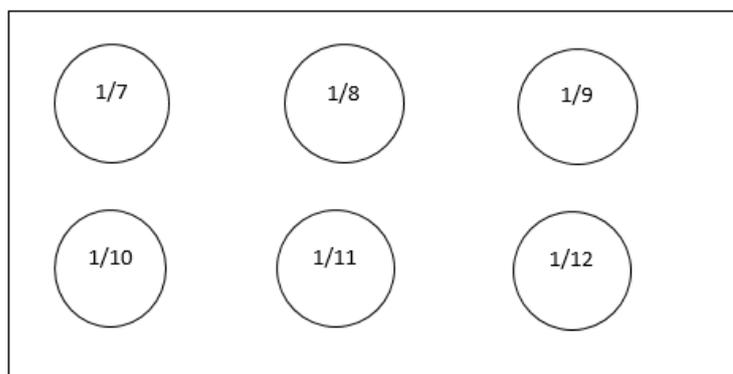


Figura 27: Ensaio de transfecção testando diferentes proporções de nanocomplexos/DMEM com diferentes pHs, em células HEK 283.

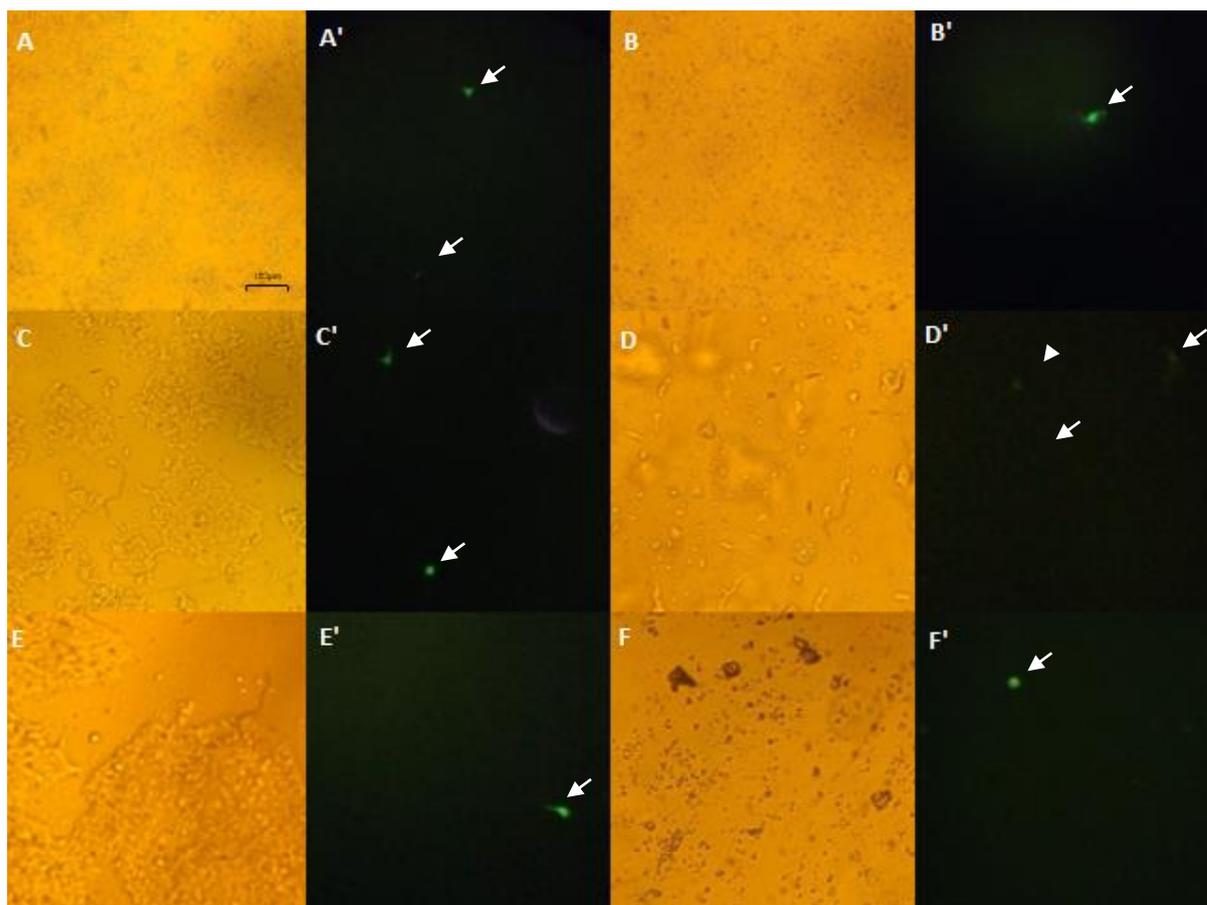


Figura 28: Células HEH 293 Transfectadas com nanocomplexos e analisadas no microscópio de fluorescência para analisar a expressão do GFP nas seguintes proporções 1/7 (A, A'), 1/8 (B, B'), 1/9 (C, C'), 1/10 (D, D'), 1/11 (E, E') e 1/12 (F, F'), no aumento de 10x.

Tabela 9: Variação do pH antes e após a transfecção em diferentes proporções de nanocomplexos e DMEM.

Proporções nano/DMEM	pH ajustado	Após a transfecção
1/7	6.25	7.13
1/8	6.33	7.33
1/9	6.42	7.48
1/10	6.55	7.55
1/11	6.58	7.64
1/12	6.60	7.68

O ensaio de transfecção utilizando PBS/SFB/nanocomplexos foram analisados no microscópio de fluorescência e na citometria de fluxo. Não foram observadas células fluorescentes quando analisados no microscópio de

fluorescência, porém utilizando a citometria de fluxo (Figura 29) detectou-se a expressão do GFP nas células mantidas no pH de 6,5 por 24 h em contato com os nanocomplexos.

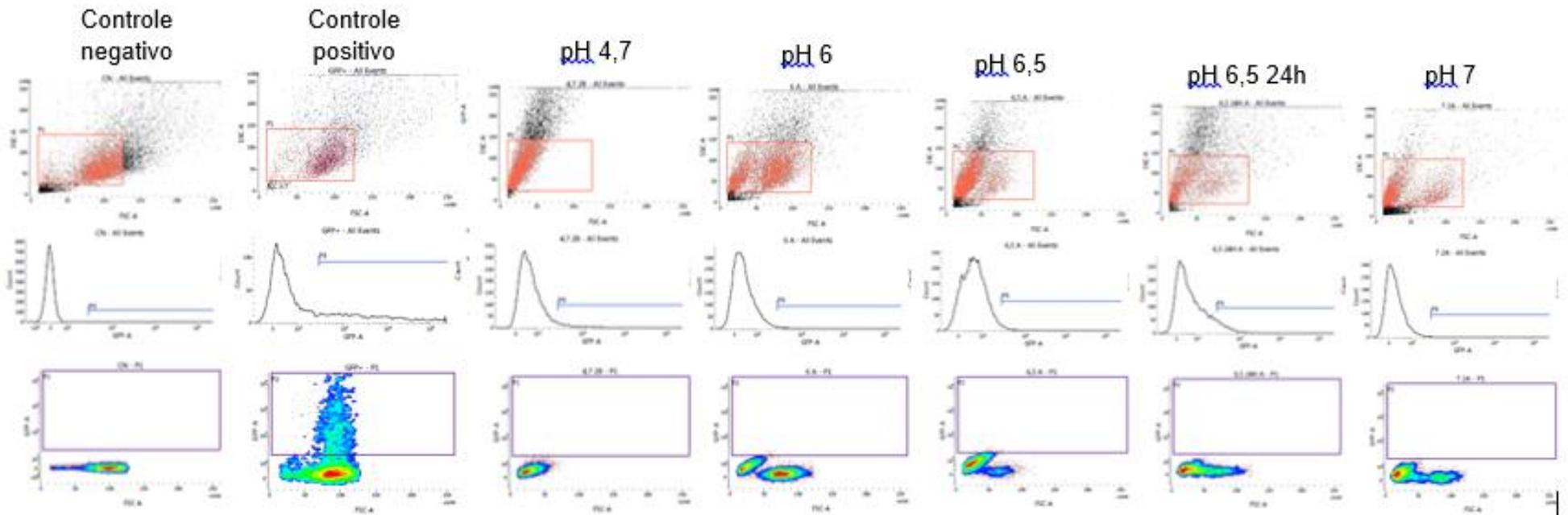


Figura 29: Influência de diferentes pHs na transfecção com nanocomplexos em HEK-293. Citograma bidimensional em dot plot de SCC (escala logarítima) X FSC (escala linear).

Dentre os grupos com NP, o tratamento com pH 6,5 em que as células foram mantidas por 24h em contato com os nanocomplexos teve maior taxa de expressão de GFP (Figura 30). Por outro lado, o tratamento pH4,7 apresentou menor taxa de expressão quando comparado aos tratamentos pH 6,5 24h e pH 7 ($P < 0,005$). O controle positivo teve maiores taxas de transfecção quando comparados todos os tratamentos ($P < 0,0001$).

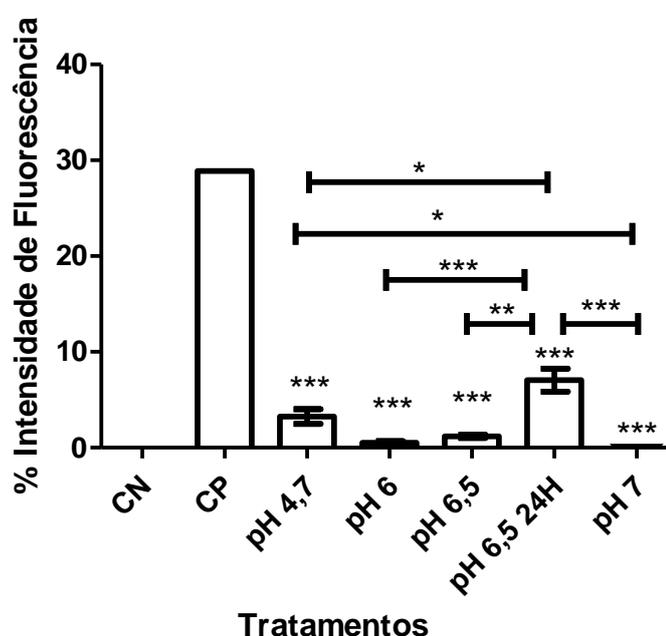


Figura 30: Intensidade de Fluorescência (%) nos diferentes tratamentos em função da variação do pH e tempo de exposição aos nanocomplexos. Diferenças significativas entre os grupos expostos aos nanocomplexos e ao controle são indicados por *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,005$.

Foram realizadas análises do potencial Zeta das NPs nos diferentes pHs no DLS (Figura 31) e notou-se que no menor pH os nanocomplexos apresentavam carga superficial positiva e com o aumento do pH a carga superficial apresentava-se negativa.

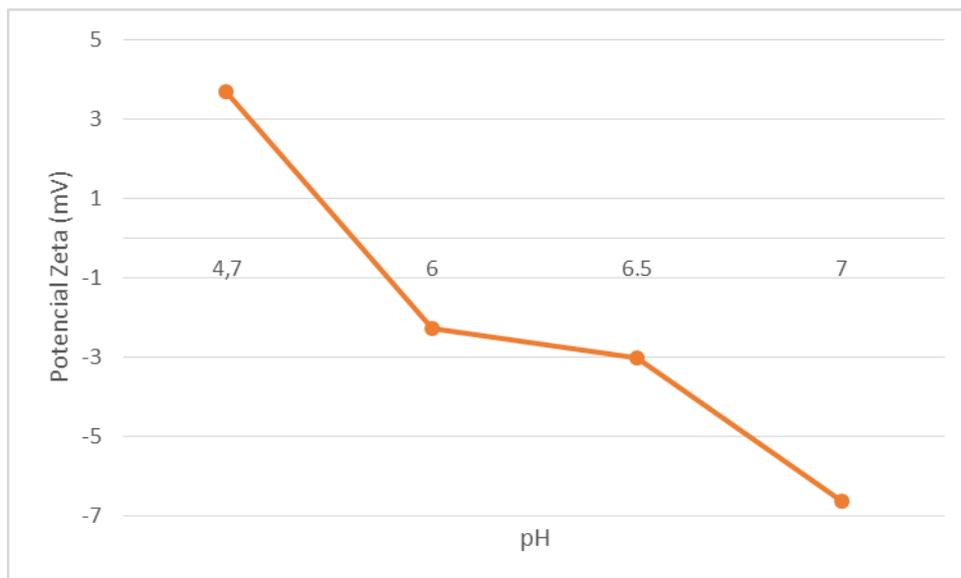


Figura 31: Variação do potencial Zeta na solução contendo nanocomplexos e PBS/SFB. A medida que o pH aumenta a carga passa a ser negativa.

No terceiro ensaio também não foram observadas células fluorescentes quando analisados no microscópio de fluorescência. Corroborando com esses achados, por meio da técnica de citometria de fluxo detectou-se a expressão do GFP (0,97 a 7, 57%). Contudo não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (4,7: 6,5: 6,5*: 7) (Figura 32).

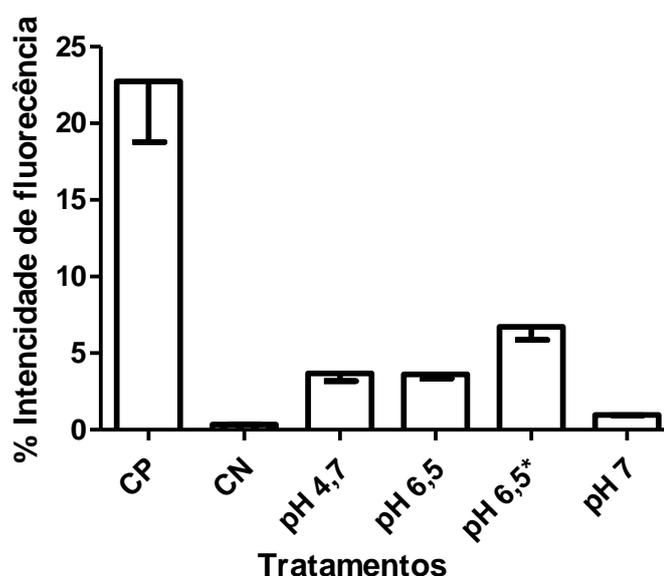


Figura 32: Intensidade de Fluorescência (%) nos diferentes tratamentos em função da variação do pH e diferença de concentração de nanocomplexo (pH6,5*). Diferenças significativas entre os grupos expostos ao nanocomplexos e ao controle são indicados por * $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A necessidade de buscar novos meios de transfectar células somáticas ocorre devido ao baixo índice de transfecção (MITTERMEYER *et al.*, 2012). Um dos meios alternativos é a utilização de nanocarreadores como sistema de carreamento de genes.

As nanopartículas de quitosana tem sido bastante estudada nos últimos tempos devido ao seu baixo custo de produção o, a abundância de matéria-prima e o aproveitamento dos subprodutos da pesca de crustáceos tornam o processo de produção de quitosana ecologicamente interessante e economicamente viável. Além disso, as nanopartículas possuem tamanho reduzido, afinidade por ácidos nucleicos (YADAV *et al.*, 2011; EDSON e KWON, 2016; SANDRESCHI *et al.*, 2016).

O presente estudo identificou uma proporção mais adequada de TPP, DNA plasmidial e quitosana para a produção de nanocomplexos que proporcionasse o uso de nanocomplexos de quitosana como carreadores de vetores de DNA para o interior de células somáticas. Assim, esse nanossistema pode ser uma alternativa aos métodos tradicionais de transfecção de células somáticas.

Diversos trabalhos vêm utilizando nanopartículas de quitosana como carreadores de fármacos e de DNA plasmidial, por ser um polímero altamente catiônico facilitando assim sua interação com o DNA. Kong, *et al.*, 2017, apresentaram resultados eficazes com a utilização de nanopartículas de quitosana conjugada com peptídeo e complexada com DNA plasmidial como um carreador para transfectar astrócitos. Baghdan, *et al.*, 2018, desenvolveram uma nanopartícula de quitosana complexada com DNA plasmidial e encapsulada em lipossomas, onde foram observados resultados positivos na transfecção em células HEK-293.

As nanopartículas sintetizadas neste trabalho foram produzidas pelo método de gelificação iônica, baseado nas interações eletrostáticas entre os grupos amino da quitosana (carregados positivamente), os grupos fosfato do TPP (carregados negativamente) e os grupos fosfato do DNA plasmidial. A quitosana apresenta ponto isoelétrico de 6,5, sendo nesse pH insolúvel em água necessitando de um meio ácido para que seja capaz de protonar os grupamentos amino, conferindo assim carga positiva à molécula (AHMED e ALJAEID, 2016).

Alguns fatores como o grau de desacetilação e peso molecular da quitosana, pH, interações de proteínas, taxa de carga de quitosana para DNA

(Relação DNA/Quitosana), influenciam diretamente no diâmetro e formação das nanoesferas. Isso ocorre porque quanto menor o valor do pH da solução de quitosana, menor o diâmetro da partícula, já que as cadeias de quitosana se tornam lineares e disponibilizam melhor o NH_3^+ para reticulação com o fosfato do TPP e com o DNA plasmidial (MATTU *et al.*, 2013). Adicionalmente, eficiência de transfecção também é influenciada pelo meio de cultura, uma vez que a quitosana é mais protonada em pH ácido, promovendo assim a ligação não apenas ao DNA carregado negativamente, mas também às células com as superfícies carregadas negativamente (NIMESH, 2010).

Em relação ao diâmetro médio, o DLS revelou uma variação de tamanhos de acordo com as proporções utilizadas desde nanopartículas com 117,7 nm a 313,9 nm. Dentre os tratamentos testados, optou-se pela proporção de 6/1/1 (quitosana: TPP: DNA plasmidial) com nanopartículas livres variando o diâmetro médio de 124,7 a 142,7 nm para a realização dos ensaios de transfecção. Esses valores permitem que as nanopartículas apresentem eficiência mais elevada na transfecção, já que NPs menores que 200 nm tendem a ter uma eficiência mais elevada na entrega de material genético para células (WEN FAN *et al.*, 2012). O PDI das nanopartículas variaram de 0,3 a 0,7, indicando a produção de dispersões homogênea (abaixo de 0,3) e heterogênea (acima de 0,3) (XU, 2015). O Potencial Zeta variou de +27 a +28mV, o que corrobora com resultados prévios já que a quitosana é um polímero catiônico (LEBRE, *et al.*, 2015; PANT e NEGI, 2018).

No trabalho realizado por ALEXANDRINO *et al.* (2017), os autores obtiveram NPs pelo método de gelificação iônica variando o tamanho de 461,9 nm a 139,8 nm usando duas concentrações de quitosana diferentes de 2g/L e 10g/L. O presente estudo utilizou o mesmo método, porém com diferentes concentrações de quitosana. Além disso, no presente estudo foram obtidos tamanho menores de NPs mais indicados para ensaios de transfecção celular. Outro estudo realizado por PILON, *et al.* (2015) obtiveram NPs de 111,72nm de tamanho, após variação da concentração de ácido cítrico da solução de quitosana de 2,0 para 4,0 mg mL⁻¹.

O nanocomplexo contendo DNA plasmidial/TPP/NPs de quitosana apresentou diâmetro variando de 387,2nm e 284,4nm e o nanocomplexo DNA plasmidial/ NPs de quitosana apresentou diâmetro variando de 351,9nm e 369,7nm. Os nanocomplexos apresentaram diâmetro maior que as nanopartículas livres (diâmetro das NPs livres 142,7nm e 124,7nm) indicando que o DNA plasmidial foi

encapsulado pelas nanopartículas. O PDI variou de 0,5 a 0,7 indicando uma dispersão heterogênea. O potencial Zeta foi menor (menos positivo) em relação as nanopartículas livres (28,4mV NPs livres, 9,04 mV NPs complexadas com TPP e 27,5mV NPs complexadas sem TPP). Isso ocorreu, provavelmente, devido a carga negativa do DNA plasmídeo.

Ao realizar os ensaios no DLS das nanopartículas complexadas no meio de cultura DMEM, observou-se um aumento no diâmetro das nanopartículas, chegando a apresentar algumas partículas com diâmetros de 2.036 nm, constituindo uma solução heterogênea, devido o PDI acima de 0,5. Esse aumento pode ser explicado pela interação entre as proteínas séricas negativamente carregadas e as partículas carregadas positivamente, esse fato também foi relatado no trabalho de LEBRE, *et al*, 2016). Em meio de cultura o potencial Zeta apresentou-se negativo, um fator limitante para a transfecção pois, uma das barreiras que o nanocomplexo tem que enfrentar é a passagem pela membrana plasmática, que é carregada negativamente, decorrente da presença superficial de glicoproteínas, glicerolfosfatos e proteoglicanos sulfatados. Devido a isso um nanocomplexo com a carga superficial negativa tende a ser repellido dificultando assim sua internalização na célula (PEREIRA *et al*, 2014; NAMVAR, *et al*, 2015). Por outro lado, NPs carregadas negativamente podem ser internalizadas após interação com sítios catiônicos da membrana celular (WILHELM *et al.*, 2003).

A imagem de AFM mostrou que a adição do plasmídeo ao sistema provocou um crescimento das nanoesferas, levando a formação de nanopartículas de quitosana composta com tamanhos que variaram entre 209 a 329 nm. Valores estes que corroboram com o encontrado no DLS, de 331,7 nm.

Análises de gel de eletroforese demonstraram que os plasmídeos livres migraram mais que aqueles que estavam associados às NPs. O DNA associado aos agentes transfectantes ficaram retidos nos poços de gel de agarose, sendo um indicativo que houve a complexação do plasmídeo às NPs. A banda mais fraca observada no poço de DNA/NPs pode ser devido à baixa concentração de DNA plasmidial na amostra devido ao efeito de diluição.

O ensaio de estabilidade mostrou que não houve diferença estatística em relação ao diâmetro médio das nanopartículas, contudo houve diferença estatística em relação ao potencial Zeta, esse fato pode estar relacionado a diversos fatores, tais como interações com partículas presentes na dispersão, quebra da cadeia

polimérica, aumentando assim a superfície de contato, entre outros. Os resultados do ensaio de gel de agarose revelou que os nanocomplexos se mantiveram estáveis após 16 dias.

No primeiro ensaio de transfecção não foi constatada expressão do GFP nas células. Esse fato pode estar relacionado a dois fatores: o primeiro deles é o potencial Zeta ter apresentado valores negativos quando na presença do meio de cultura, dificultando a passagem dos nanocomplexos pela membrana celular devido a repulsão eletrostática. Um outro fator, poderia ser o pH, que segundo NIMESH, et.al (2010), o pH do meio afeta diretamente na eficiência de transfecção utilizando nanopartículas de quitosana. Esse trabalho encontrou uma melhor eficiência de transfecção em pH 6,5, contudo nesse pH a viabilidade celular diminuiu em relação ao pH de 7,1. No presente estudo o pH final do meio com os nanocomplexo foi de 7,0.

O segundo ensaio de transfecção foi realizado a fim de se ajustar o pH para o ideal utilizando diferentes proporções entre os nanocomplexos com o meio DMEM. Contudo, devido a presença de carbonatos no meio o pH alterou para neutro influenciando na taxa de transfecção, o qual foi menor.

No terceiro ensaio foi utilizado PBS/SFB/nanocomplexos houve uma melhora na taxa de transfecção, percebendo assim que o potencial Zeta, pH e tempo de exposição estão diretamente relacionados na eficiência de transfecção, já que o tratamento em que as células ficaram exposta por 24 horas apresentaram uma melhor eficiência de transfecção em relação aos outros tratamentos.

O quarto ensaio de transfecção gênica não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, contudo pode-se observar uma tendência a uma melhor expressão do GFP no tratamento utilizando o pH 6,5 com uma concentração maior dos nanocomplexos. Isso pode ser atribuído ao fato do pH ácido influencie na desintegração do nanocomplexos e consequente liberação do material genético no interior das células (PEREIRA, *et al.*, 2014).

O estudo tem como perspectivas investigar diferentes tempos de exposição associados a variados valores de pH para utilização de nanocomplexos de quitosana que promovam a transfecção celular sem induzir citotoxicidade.

7. CONCLUSÕES

A partir do método de gelificação iônica utilizando a proporção de 6/1/1/ de solução de quitosana, TPP e plasmídeo foi possível desenvolver nanocomplexos com baixo diâmetro necessário para aplicações de transfecção gênica. Através do ensaio de complexação pode-se ter indícios da incorporação do plasmídeo às NPs de quitosana.

Em pH neutro os nanocomplexos foram capazes de liberar o material genético no interior das células, porém a eficiência de transfecção foi baixa.

O potencial Zeta, pH e tempo de exposição estão diretamente relacionados na eficiência de transfecção, sendo que o potencial Zeta positivo, o pH 6,5 (ácido) e o tempo de exposição maior aumentaram a eficiência da transfecção.

O trabalho colaborou com a padronização da síntese de NPs de quitosana visando aplicações em transfecção gênica, uma vez que diferentes condições de transfecção influenciam na transfecção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, Sunil A.; MALLIKARJUNA, Nadagouda N.; AMINABHAVI, Tejraj M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release** 100 (2004) 5 – 28.

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483-507, 2016.

ALEXANDRINO, T. T. B.; TOSI, M. M; ODÍLIO B. GARRIDO ASSIS, O. B. G. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TPP COMO INIBIDORAS DO CRESCIMENTO FÚNGICO. **IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP, 21 a 22 de Novembro de 2017

AJUN, W.; YAN, S./ LI, G. & LI HUILI. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release study. **Carbohydr. Polym.** 75: 566, 2009.

AKAGI, S., GESHI, M., AND NAGAI, T. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. **Anim. Sci. J.** 84, 191– 199, 2013.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. Dissertação (Mestrado em Química) - **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa - PB, 2007.

AOUADA, Marcia Regina de Moura. Aplicação de nanopartículas em filme utilizados em embalagens para alimentos. 138f. Tese (doutorado). **Universidade Federal de São Carlos**, Físico-Químico. São Carlos, 2009.

ASAI, T. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels. Department of Medical Biochemistry (Graduate Division of Pharmaceutical Sciences) – **University of Shizuoka**. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 11, p. 1855-1861, 2012.

AVŞAR-BAN, E., MIYAKE H., OBATA, M., HASHIMOTO, M., TAMARU, Y. High-Throughput Injection System for Zebrafish Fertilized Eggs, **Journal Data Mining Genomics Proteomics**, v.4, i.3, 2013.

AZEVEDO, Marcelo Mantovani Martiniano. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Workshop Do Curso: Tópicos Especiais Em ..., p. 1–20, 2003. Disponível em:

<<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoesferas+e+a+libera??o+controlada+de+f?rmacos#0>>.

BABICK, F.; GROPP, S.; KÄTZEL, U.; VORBAU, M. Dynamic light scattering of dispersed fumed silica aggregates 217 (2012) 39e45.

BAGHDAN, E; PINNAPIREDDY, S. R, STREHLOW, B; ENGELHARDT, K. H; SCHÄFER, J; BAKOWSKY, U; Lipid coated chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 535 (2018) 473–479.

BALBINO, T.A., AOKI, N.T., GASPERINI, A.A.M., OLIVEIRA, C.L.P., AZZONI, A.R., CAVALCANTI, L.P., & DE LA TORRE, L.G. (2013). Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, 226, 423–433.

BARKALINA N, JONES C, COWARD K, Nanomedicine and mammalian sperm: lessons from the porcine model, **Theriogenology** (2015), doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.025.

BASTIAANSEN JWM, BOVENHUIS H, GROENEN MAM, MEGENS HJ, MULDER HA. The impact of genome editing on the introduction of monogenic traits in livestock. **Genet Sel Evol**. 2018 Apr 16;50(1):18.

BATERSON, P, *et al* The use of genetically modified animals, **The Royal Society**, v.1 p. 1-45, 2001.

BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B. DE, & MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), 167–179, 2007.

BERGER J, *et al*. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut*. 2004;57:35-52.

BERILLO, D., MATTIASSON, B., KIRSEBOM, H. Cryogelation of chitosan using noble metal ions: in situ formation of nanoparticles. **Biomacromolecules** 15, 2246–2255, 2014.

BERTONCINI, Clelia. (2009). Técnica de Transgenia. 485-490.

BLANCO, E., SHEN, H., FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nat. Biotechnol.** 33, 941–951, 2015.

BRESSAN, F. F., SANGALLI, J. R., PESSÔA, L. V. F., PIRES, P. R. L., & MEIRELLES, F. V. Insights on bovine genetic engineering and cloning. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(suppl 1), 113–118, (2013).

BRIGGS, R., AND T. J. KING. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 38:455–463.

BORGES, O.; TAVARES, J.; SOUSA, A. DE, BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. & CORDEIRO. DA- SILVA, A. " Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate- coated chitosan nanoparticles" **Eur. J. Pharm. Sci.**, 32: 278, 2007.

BRUNEL, F., VERON, L., LADAVIERE, C., DAVID, L., DOMARD, A., DELAIR, T. Synthesis and structural characterization of chitosan nanogels. **Langmuir** 25, 8935–8943, 2009.

CALIÓ, MICHELE & BERTONCINI, CLELIA. (2017). **Trangênicos: Técnicas de Produção e Progressos na Aplicação Científica**. 447-463

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan–polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R. Extraction, structures and properties of alpha-DNA beta- chitin, 2007.

CAMPOS, A. M. *et al.* Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: *in vitro* Stability, *in Vivo* Fate, and Cellular Toxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 5, 2004.

CANELLA, M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CASETTARI, L., VLLASALIU, D., CASTAGNINO, E., STOLNIK, S., HOWDLE, S., ILLUM, L. PEGylated chitosan derivatives: synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 659–685, 2012.

CERIZE, N. N. P. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica. Tese de Doutorado (**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**) – USP, Ribeirão Preto – SP, p. 48, 2012.

CHANDRASHEKARAN, A. *et al.* Efficient generation of transgenic mice by lentivirus-mediated modification of spermatozoa, **FASEB Journal**, v. 28, 2014.

CHRENEK, Peter. Pronuclear Microinjection of Rabbit Fertilized Eggs, **JSM Cell Dev Biol** 5, v. 1, p. 1020, 2017.

CLARK, J., WHITELAW, B. A future for transgenic livestock, **Nature Reviews: Genetics**, v. 4, p. 825 – 833, 2003.

COSTA, Ana Carolina da Silva. Nanopartículas de quitosana para aplicação em sanidade de tambaquis amazônicos (*colossoma macropomum*). 90f. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal do Pará**, 2013.

CUMMINS, H. Z.; KNABLE, N.; YEH, Y. Observation of diffusion broadening of Rayleigh scattered light, *Phys. Rev. Lett.* 12 (1964) 150e152.

DAIGNEAULT, B. W.; VILARINO, M.; RAJPUT, S. K.; FRUM, T.; SMITH, G. W.; ROSS, P. J. CRISPR editing validation, immunostaining and DNA sequencing of individual fixed bovine embryoS. **BioTechniques** 65 : 281 - 283 (November 2018).

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DEMENEIX, B; BEHR, J. P. Polyethylenimine (PEI). Cap, 8 .**Advances in Genetics**, Vol. 53.

DU, W. L., XU, Z. R., HAN, X. Y., *et al.*, 2008, "Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye", **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, issue 1-2, pp. 152-156.

DU, W.; NIU, S-S.; XU, Z-R. & FAN, C-L. "Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions". **Carbohydr. Polym**, 75: 385, 2009.

DUDHANI, A. R., KOSARAJU, S. L., 2010, "Bioadhesive chitosannanoparticles: Preparation and characterization", **Carbohydrate Polymers**, v. 81, pp. 243-251.

DÚRAN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1127–1134, 2013.

DÜZGÜNES, N., TROS DE ILARDUYA, C., SIMÕES, S., ZHDANOV, R.I., KONOPKA, K., PEDROSO DE LIMA, M.C. Cationic liposomes for gene delivery: novel cationic lipids and enhancement by proteins and peptides. **Curr. Med. Chem.** 10, 1213–1220, 2003.

EDSON, J. A.; KWON, Y. J. Design, challenge, and promise of stimuli-responsive nanoantibiotics. **Nano Convergence**, v. 3, n. 26, p. 1-13, 2016.

EIBE. European Initiative for Biotechnology Education. Transgenic Animals; unit, 11. 1998.

ESCORS, D., BRECKPOT, K. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential, **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v. 58, p. 107–119, 2010.

FADEEL B, GARCIA-BENNETT A, Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles for manufactured for biomedical applications, **Advanced drug delivery reviews**, 2010, 62, 362 – 374.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 90, 21–27, 2012.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 1-32, 2012.

FELGNER, P. L.; RINGOLD, G. M. Cationic liposome- mediated transfection. **Nature**. V.337, n. 6205, p. 387-388, 1989.

FISCHER H, CHAN W, Nanotoxicity: the growing need for *in vitro* studys, **Current Opinion on Biotechnology**, 2007, 18, 565 – 571.

FURLANETO, L. (2006) Transformação genética de *Trypanosoma cruzi* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular. Faculdade Federal do Paraná

GALEMBECK, F.; RIPPEL, M. M. Nanocompósitos poliméricos e nanofármacos : fatos , oportunidades e estratégias. *Parcerias Estratégicas*, v. 9, n. 18, p. 41–60, 2004.

GANGULY, K., CHATURVEDI, K., MORE, U.A., NADAGOUDA, M.N., AMINABHAVI, T.M. Polysaccharide-based micro/nanohydrogels for delivering macromolecular therapeutics. *J. Control. Release* 193, 162–173, 2014.

GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P.; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486-492, 2008.

GHORMADE V, DESHPANDE MV, PAKNIKAR KM. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnol Adv** 29(6):792–803., 2011.

GORDON, J W; RUDDLE, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, v. 214(, n. 4526, p. 1244–1246., 1981.

GORDON, J. W. *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7380–4, dez. 1980.

GOSSLER A., DOETSCHMAN T., KORN R., SERFLING E. & KEMLER R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 83:9065-9069, 1986.

GROLL, A. V. Lipídios catiônicos anfílicos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção *in vitro* de células eucarióticas. 102f. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, faculdade de veterinária, Porto Alegre, 2003.

GOY,R.C, ASIS,O.B.; CAMPANA-FILHO,S.P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ed nº33, 2004

GURDON, J. B., T. R. ELSDALE, AND M. FISCHBERG. 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. **Nature** 182:64–65.

GUSMÃO, A. M.; SILVA, A. R.; MEDEIROS, M. O. A Biotecnologia e os Avanços da Sociedade. **Biodiversidade** - V.16, N1, 2017 - pág. 135.

HAMMER R.E., PURSEL V.G., REXROAD JR C.E., WALL R.J., BOLT D.J., EBERT K.M., PALMITER, R.D. & BRINSTER R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, 315:680-683, 1985.

HAMIDI, Mehrdad; AZADI, Amir; RAFIEI, Pedram. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HASANZADEH, RAMIN, ZANDI, MOHAMMAD, SANJABI,MOHAMMAD REZA, PAJOOH, KHOSRO HOSEINI, SHABANI, HOSSIN, Expression of fluorescent reporter protein was not obtained in ovine embryos produced through *in vitro*fertilization-sperm mediated gene transfer (IVF-SMGT). **Small Ruminant Research**, 2016.

HAUGSTAD, G. Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and **Advanced Applications**. New Jersey: JohnWiley & Sons, Inc., 2012.

HOFMANN A., KESSLER B., EWERLING S., WEPPERT M., VOGG B., LUDWIG H., STOJKOVIC M., BOELHAUVE M., BREM G., WOLF E. & PFEIFER A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO Rept** 4:1054- 1060. 2003.

HOFMANN A., ZAKHARTCHENKO V., WEPPERT M., SEBALD H., WENIGERKIND H., BREM G., WOLF E. & PFEIFER A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biol. Reprod.** 71:405-409. 2004.

ISHINO, T.; HASHIMOTO, M.; AMAGASA, M.; SAITO, N.; DOCHI, O.; KIRISAWA, R.; KITAMURAH. Establishment of protocol for preparation of gene-edited bovine ear-derived fibroblasts for somatic cell nuclear transplantation. **Biomedical Research** (Tokyo) 39 (2) 95–104, 2018.

JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 73, n. 4, p. 1260-1264, 1976.

JONASSEN, H., KJØNIKSEN, A.L., HIORTH, M. Stability of chitosan nanoparticles crosslinked with tripolyphosphate. *Biomacro* 13, 3747–3756, 2012.

KAESTNER, L., SCHOLZ, A., LIPP, P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1171–1176, 2015.

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Jul 21; 112(29): 8874–8878, 2015.

KIM, E.Y., PARK, M.J., PARK, H.Y., NOH, E.J., NOH, E.H., PARK, K.S., LEE, J.B., JEONG, C.J., RIU, K.Z., AND PARK, S.P. Improved cloning efficiency and developmental potential in bovine somatic cell nuclear transfer with the oosight imaging system. **Cell. Reprogram**. 14, 305–311, 2012.

KONGA, F; LIUB, G; ZHOUC, S; GUOB, J; CHENA, S; WANGB,Z. Superior transfection efficiency of phagocytic astrocytes by largechitosan/DNA nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 105 (2017) 1473–1481.

KOPING-HOGGARD, M., VARUM, K.M., ISSA, M., DANIELSEN, S., CHRISTENSEN, B.E., STOKKE, B.T., *et al.*, 2004. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther.* 11, 1441–1452.

KUMAR. M. N; V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers** 46 (2000) 1–27.

LARANJEIRA, M. C. M ; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quimica Nova*, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com

tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

LEBRE, F., BORCHARD, G., FANECA, H., PEDROSO DE LIMA, M. C., & BORGES, O. Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. ***Molecular Pharmaceutics***, 13(2), 472–482, 2016.

LEVINE, S., GRABEL, L. The contribution of human/non-human animal chimeras to stem cell research, ***Stem Cell Research***, v.24, p. 128-134, 2017.

LIANG, S; NIE, Z. W; 1,A, GUO, NIU, . J; SHIN, K. T; OCK, S. A; CUI, X. S. Overexpression of MicroRNA-29b Decreases Expression of DNA Methyltransferases and Improves Quality of the Blastocysts Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer in Cattle. ***Microscopy and Microanalysis*** (2018), 24, 29–37.

LIMA, Edson Gomes de. Nanotecnologia: biotecnologias e novas ciências. 274p. 1 ed. Rio de Janeiro: **Interciências**, 2014.

LIU, L; CAI, X.; ZHANG, J.; XU, C. Particle-size measurements in a micro-channel with image dynamic light scattering method, ***Procedia Eng.*** 102 (2015) 904e910.

MASHIKO, D. *et al.* Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA, ***Scientific Reports***, v. 3, n.3355, 2013.

MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan Nanoparticles as Therapeutic Protein Nanocarriers: the Effect of pH on Particle Formation and Encapsulation Efficiency. ***Polymer composites***, p. 1-8, 2013.

MERTEN, O.W., HEBBEN, M., BOVOLENTA, C. Production of lentiviral vectors, *Molecular Therapy* — ***Methods & Clinical Development***, v. 3, n. 16017, 2016.

METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, n. 2, p. 119-123, 2003.

MITTERMEYER, Gabriele *et al.* Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson ' s Disease. v. 381, n. April, p. 377–381, 2012.

MOORE, S. G; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science** Vol. 100 No. 12, 2017.

MORAES, M., CARVALHO, J.M.P., SILVA, C.R., CHO, S., SOLA, M.R., & PINHO, S.C. (2013). Liposomes encapsulating β -carotene produced by the proliposomes method: characterization and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science and Technology**, 48, 274–282.

MOHAN RR, TOVEY JC, SHARMA A, TANDON A (2012) Gene therapy in the cornea: 2005–present. **Prog Retin Eye Res** 31: 43–64.

MUNK, M.; LADEIRA, L.O. ; CARVALHO, B. C. ; CAMARGO, L S A ; BARBOSA, N. R. ; SERAPIAO, R. V. ; QUINTÃO, C.C.R. ; DA SILVA, S.R. ; SOARES, J.S. ; JORIO, ADO ; BRANDÃO, H.M. . Efficient delivery of DNA into bovine preimplantation embryos by multiwall carbon nanotubes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33588, 2016.

NAMVAR A., BOLHASSANI A., KHAIRKHAH N., MOTEVALLI F. - Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection. **Biopolymers**, 2015; 103 (7): 363–75.

NEAGOE, Ioana Berindan *et al.* Efficient siRNA Delivery System Using Carboxylated Single-Wall Carbon Nanotubes in Cancer Treatment. v. 8, n. 4, p. 567–574, 2012.

NEVES, A. L. De P. Preparação e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana Incorporadas com Zinco com Potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. 2013.

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO Journal**. v.1, p. 841-845. 1982.

NGUYEN, M. T, CHOI S. P, LEE, J.; LEE, J. H.; SIM, S. J. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **J Microbiol Biotechnol**. 2009 Feb;19(2):161-6.

NIEMANN, H. *et al.* Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 151-163, 2008.

NIMESH, S.; THIBAUT, M. M.; LAVERTU, M.; BUSCHMANN, M. D. Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum. **Mol Biotechnol** (2010) 46:182–196.

NOVAES, A. M. B. Desenvolvimento Tecnológico e Desenvolvimento econômico: A nanotecnologia como instrumento para superar a pobreza no Brasil. (MESTRADO). Universidade Prebiteriana Mackenzie. 2016.

OBBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine** 267; 89–105 91, 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, E, N. Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos. 139f. Tese (doutorado). **Faculdade de Engenharia Química, Campinas**, 2006.

PANT, A., & NEGI, J. S. Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- β -CD inclusion complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 112, 180–185. 2018.

PAPINI, C.J. Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula. 130f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). **Autarquia associada à universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 2, 421-430, 2010.

PAULA, R, S.; SANTOS, K. J. G.; PALES, A. P.; CASTRO, C. S.; LOPES, J. C. S.; SANTOS, J. F. D. Animais Transgênicos: Conceito, Metodologias e Aplicações.

PEREIRA P., SOUSA F., FIGUEIRAS A. - Polyplexes as Nanovectors for Gene Therapy. In: GOVIL J. N., KUMAR A., **Biotechnology Volume 10 Nanobiotechnology**, Boston: Studium Press LLC, 2014. ISBN: 1-62699-025-5. p. 179–223

PILON, L.; SPRICIGO, P.C.; MIRANDA, M.; MOURA, M.R.; ASSIS, O.B.G.; MATTOSO, L.H.C.; FERREIRA, M.D. Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 440-448, 2015.

PINTO. E. P.; RAMOS, G. Q.; FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Estação Científica (UNIFAP) Macapá*, v. 3, n. 2, p. 41-50, jul.-dez. 2013.

POTTER, H.; HELLER, R.; Transfection by eletroporation. In: **Curr Protoc. Cell Biol** **Capitulo 9.3**, 2011.

POWELL AM, TALBOT NC, WELLS KD, KERR DE, PURSEL VG, WALL RJ. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod.** 2004 Jul;71(1):210-6.

QI, L., XU, Z., JIANG, X., et al.” Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles”, *Carbohydrate research*, v. 339, issue 16, pp. 2693-2700, 2004.

QI, L., XU, Z., JIANG, X., *et al.* “Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles”, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, issue 5, pp. 1397-1399, 2005.

RAMAMOORTH, MURALI; NARVEKAR, APARNA. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. **Journal of Clinical and Diagnostic Research.** 2015 Jan, Vol-9(1): GE01-GE06

ROSA, S. Adsorção de corantes reativos utilizando sal quaternário de quitosana como adsorvente. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2009.

ROSAZZA, C.; PHEZ, E.; ESCOFFRE, J.-M. *et al.* Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer: Evidence for the involvement of endocytotic pathways. **International Journal of Pharmaceutics.** doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.024, 2011.

SAKUMA T., BARRY, M. A., IKEDA Lentiviral vectors: basic to translational, **Biochemical Journal**, v. 443, p. 603–618, 2012.

SANDRESCHI; PIRAS; BATONI; CHIELLINI. Perspectives on polymeric nanostructures for the therapeutic application of antimicrobial peptides. **Nanomedicine**, v. 11, n.13, p. 1729–1744, 2016.

SELF, W. K.; SCHOCH, K. M.; ALEX, J.; ELEM, N. B.; BOLLINGER, J. G.; SATO, C.; COLE, T.; KORDASIEWICZ, H. B.; SWAYZE, E.; BATEMAN, R. J.; MILLER, T. M. Protein production is an early biomarker for RNA-targeted therapies. **Annals of Clinical and Translational Neurology** 2018; 5(12): 1492–1504.

SCHNIEKE, A. E. Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts. **Science**, 278(5346), 2130–2133. doi:10.1126/science.278.5346.2130, 1997.

SILVA, Z. Transfecção de espermatozoides suínos por polifecção e eletroporação. 96f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

SONG, F., LIU, T., MENG, S., LI, F., ZHANG, Y., & JIANG, L. Insulin-Like Growth Factor-1 Alleviates Expression of A β 1–40 and α -, β -, and γ -Secretases in the Cortex and Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2018.

SOSA, Miguel A. G., GASPERI, Rita, ELDER, Gregory A. Animal transgenesis: na overview, **Brain Struct Funct**, v. 214, p. 91-109, 2010.

STAMFORD ARNAUD, T. M. Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes. 183f. **Tese** (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

TAN, C., XIA, S., XUE, J., XIE, J., FENG, B., & ZHANG, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 8175–8184.

TAN, C., ZHANG, Y., ABBAS, S., FENG, B., ZHANG, X., & XIA, S. (2014a). Modulation of the carotenoid bioaccessibility through liposomal encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 692–700.

TAVARES, Idylla Silva. Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana. 56f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade federal do rio Grande do Norte, pós graduação em Química. Natal, 2011.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.. “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application”. *Progress in Polymer Science*. 2011. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.

TISCORNIA, G., SINGER, O., VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors, **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, 2006.

THOMAS, M., GE, Q., LU, J. J., CHEN, J., & KLIBANOV, A. (2005). Cross-linked Small Polyethylenimines: While Still Nontoxic, Deliver DNA Efficiently to Mammalian Cells *in vitro* and *in Vivo*. **Pharmaceutical**.

TORRE, LG DE LA; PINHO, SC DE. Lipid matrices for nanoencapsulation in food: liposomes and lipid nanoparticles. Food nanoscience and nanotechnology, 99-143 .2015

TRECENTI, A. S.; ZAPPA, V. Clonagem animal: Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano XI – Número 20 – Janeiro de 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WAKCHAURE, R., GANGULY, S, PRAVEEN, P. K., PARA, P. A. Transgenic Animals: A Review on its Various Dimensions and Applications in Animal Biotechnology, **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 5, i. 11, 2015.

WANG, J.; YAN, X.; NESENGANI, L. T.; DING, H.; YANG, L.; LU, W. LPS-induces IL-6 and IL-8 gene expression in bovine endometrial cells “through DNA methylation”. **Gene** 677 (2018) 266–272.

WEBER, R.; SCHWEIGER, G. Photon correlation spectroscopy on flowing polydisperse fluid-particle systems: theory, **Appl. Opt.** 37 (1998) 4039e4050.

WEN FAN; WEN FANA, WEI YAN, ZUSHUN XU, HONG NI. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J. N.; BACRI, J. -C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, p. 1001-1011, 2003.

WILMUT, I., SCHNIEKE, A. E., MCWHIR, J., KIND, A. J., & CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, 385(6619), 810–813, 1997.

WONG, Joanna K.L.; MOHSENI, Rashin; HAMIDIEH, Amir Ali; MACLAREN, Robert E.; HABIB, Nagy; SEIFALIAN, Alexander M. Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery? **Trends in Biotechnology**, May 2017, Vol. 35, No. 5

WU, M.; YUAN, F. Membrane binding of plasmid DNA and endocytic pathways are involved in electrotransfection of mammalian cells. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20923. doi: 10.1371/journal.pone.0020923, 2011.

XIA, W., *et al.* Biological activities of chitosan chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, p.1-10, 2010.

XU, R. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology* 18 (2015) 11–21.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, p. 173–187, 2011.

YUM, S.Y. *et al.* Efficient generation of transgenic cattle using the DNA transposon and their analysis by nextgeneration sequencing, **Scientific Reports**, v. 7, n. 27185, 2016.

ZANIBONI, A.; SPINACI, M.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; FORNI, M.; BACCI, M.L. X and Y chromosome bearing spermatozoa are equally able to uptake and internalize exogenous DNA by sperm-mediated gene transfer in swine. *Research in Veterinary Science* 104 (2016) 1-3.