

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Maria Eduarda Zimmermann

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
PARA O SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA
ESTRUTURAL S DO VÍRUS SARS-COV-2 EM CULTURA CELULAR POR RNA DE
INTERFERÊNCIA.**

Florianópolis

2023

Maria Eduarda Zimmermann

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
PARA O SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA
ESTRUTURAS DO VÍRUS SARS-COV-2 EM CULTURA CELULAR POR RNA DE
INTERFERÊNCIA.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Coorientador: Dra. Adny Henrique Silva

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zimmermann, Maria Eduarda
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
HÍBRIDAS PARA O SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA ESTRUTURAL S DO VÍRUS SARS-COV-2 EM CULTURA
CELULAR POR RNA DE INTERFERÊNCIA. / Maria Eduarda
Zimmermann ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa,
coorientadora, Adny Henrique Silva, 2023.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. SARS-CoV-2. 3. siRNA. 4. Nanopartículas.
I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski . II. Silva, Adny
Henrique . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Maria Eduarda Zimmermann

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
PARA O SILENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA
ESTRUTURAL S DO VÍRUS SARS-COV-2 EM CULTURA CELULAR POR RNA DE
INTERFERÊNCIA.**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 13 de Fevereiro de 2023.

Prof. Dra. Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Fabiola Branco Filippin Monteiro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Ms. Anne Natalie Prigol
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha amada família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Rosani, Leopoldo, Otavio e Rose, por toda a força, incentivo e amor. Obrigada por cada conselho, por cada colo nos momentos difíceis. Amo vocês.

Aos amigos da vida, que a universidade me proporcionou conhecer e crescer junto, Renata, Pedro e Calvin. Aos amigos de longa data Robles, Vini, Paulo, Giorgio e Victoria. Aos amigos e colegas de curso que fizeram tudo mais leve, Manu, Nandinha, Larissa, Mariana, Carol, e ao grande grupo TPEV. Obrigada por todos os dias que tornaram esse período inesquecível. Ao meu amigo Tibério, por todas as conversas, por todos os conselhos acadêmicos e por sempre me motivar a continuar. Vocês todos sempre terão um lugarzinho no meu coração.

Ao pôs do sol em quatro patas, Aruna. Obrigada por tanto amor, companhia e divertimento.

À Professora Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, orientadora deste trabalho, por toda paciência e apoio. Obrigada por todo o conhecimento desde as aulas da graduação até nos experimentos do laboratório, sem ele o gosto pela pesquisa não teria crescido no meu coração.

À Adny, co-orientadora deste trabalho, por todo o suporte, incentivos e conselhos que levarei para minha vida sempre. Sua habilidade e paciência, para me ensinar deixaram minha trajetória mais leve e feliz. Obrigada pela sua disponibilidade, por incontáveis reuniões e mensagens de última hora. Aos colegas de laboratório, do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM, Karen, Carol, Julia, obrigada pelo ambiente incrível de pesquisa e todo o acolhimento.

Agradeço a Anne, banca deste trabalho, por ter aceitado avaliar e contribuir para o crescimento da minha pesquisa. Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar nos experimentos do meu projeto de iniciação científica e por receber as minhas dúvidas de braços abertos no laboratório. Agradeço também a professora Fabíola, por ter aceitado o convite para ser banca desde trabalho. Obrigada por todos os seus ensinamentos no dia a dia do laboratório, afinal como você me disse uma vez – só quebra vidraria quem está trabalhando. Seus conselhos contribuíram para que este trabalho ficasse mais completo.

Obrigada a todos os professores pelo ensino de qualidade. E por fim, minha eterna gratidão a Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de excelência, por todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal, por ter se tornado casa e um lugar que sempre terei muito orgulho de ter sido aluna.

*‘É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada
até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em
casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade viver [...]’*

- Martin Luther King.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença causada por um novo coronavírus designado como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com um genoma de RNA de fita simples que se espalha pelas vias do trato respiratório, por gotículas, secreções respiratórias e/ou por contato direto. O vírus possui quatro proteínas estruturais necessárias para regular a função e a estrutura viral. O gene que codifica a proteína S foi o alvo do presente trabalho, pois permite a ligação do vírus aos receptores da superfície da célula hospedeira e subsequente fusão entre as membranas facilitando a entrada do vírus na célula. A utilização de pequeno RNA de interferência (do inglês, small interfering RNAs - siRNAs) como terapia pode controlar infecções virais humanas pela supressão da expressão de um gene viral por meio da inviabilização do RNA mensageiro (mRNA) pela ligação por complementaridade. No entanto, para que esse mecanismo ocorra, são necessários nanocarreadores para a proteção e transporte dos ácidos nucleicos para o interior da célula. Sendo assim, o objetivo principal desse projeto é desenvolver uma nova abordagem terapêutica utilizando siRNAs para o silenciamento do gene codificador da proteína estrutural S do vírus SARS-CoV-2, visando diminuir a replicação do vírus. Para tanto, uma sequência efetiva e específica de siRNA complementar à proteína S do Sars-CoV-2 foi desenhada. Para o desenho do siRNA para o gene que codifica a proteína S, foi utilizada a ferramenta Whitehead siRNA Selection Server. Assim, a sequência que melhor enquadrou-se em critérios propostos para desenho de siRNAs foi UUA AAAUAAUAAUGAAA AUGGA. Para eficiente entrega da molécula, sistemas nanoestruturados constituídos por fosfato de cálcio e copolímero de polietileno(glicol)-poliânion foram preparados através da auto associação dos componentes. As nanopartículas foram caracterizadas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), índice de polidispersão (PdI) e Potencial Zeta no equipamento Zetasizer Nano ZS. As formulações NP-siRNA e *mock* apresentaram tamanhos com diâmetro médio de $52 \text{ nm} \pm 5$ e $61 \text{ nm} \pm$ e PdI de $0,13 \pm 0,04$ e $0,12 \pm 0,03$ respectivamente. A carga superficial das nanopartículas, avaliada pelo potencial zeta, foi de $-0,09 \pm 0,02 \text{ mV}$ para NP-siRNA e $-0,03 \pm 0,20 \text{ mV}$ para *mock*. Os ensaios de estabilidade indicaram que a formulação manteve-se estável durante 21 dias em temperatura controlada de 4°C em relação ao tamanho, PdI e potencial zeta. Avaliou-se a citotoxicidade das nanopartículas contendo o siRNA (NP-siRNA) em linhagem celular Vero E6 e L929. Não demonstrando citotoxicidade até a concentração de 200 nM, nos tempos de incubação de 24h e 48h. A formulação não produziu hemólise. Assim, foi possível preparar nanopartículas a partir de uma técnica simples e de baixo custo, com tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta adequados para serem utilizadas na transfecção de siRNA, bem como boa estabilidade e sem apresentar toxicidade para as linhagens celulares testadas.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; siRNA; Nanopartículas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização genômica do SARS CoV2	18
Figura 2 - Proteínas estruturais do SARS-CoV-2	19
Figura 3 - Mecanismo de entrada viral do SARS-COV-2.....	20
Figura 4 - Principais componentes da imunidade adaptativa nas respostas imunes virais	24
Figura 5 - Esquemas conceituais da cinética das respostas imunes ao SARS-CoV-2 e gravidade da doença.	25
Figura 6 - Mecanismo de silenciamento de genes mediado por siRNA	28
Figura 7 – Desafios da terapia de silenciamento de genes mediada por siRNA	30
Figura 8 - Ilustração esquemática de uma nanopartículas híbrida CaP-PEG-Poliânion contendo siRNA	31
Figura 9 - Gráficos de comparação do tamanho da nanopartículas e PDI das formulações <i>mock</i> e NP-siRNA.	42
Figura 10 - Avaliação da estabilidade da NP-siRNA em diferentes temperaturas. ...	44
Figura 11 - Viabilidade celular das células Vero E6 após de incubação com as formulações.	45
Figura 12 - Viabilidade celular das células L-929 após de incubação com as formulações.	46
Figura 13 - Ensaio de hemólise	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos atualmente aprovados para o tratamento da COVID-19...	22
Tabela 2 - Sequência de siRNA desenhada para obtenção do transcrito primário dos genes da proteína S do SARS-CoV-2.....	40
Tabela 3 - Caracterização das nanopartículas híbridas	41
Tabela 4 - Potencial Zeta das formulações <i>mock</i> e NP-siRNA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACE2 - Enzima conversora de angiotensina
- AGO2 - Proteína Argonauta 2
- BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local
- CaP - Fosfato de Cálcio
- Covid-19 - Corona Virus Disease
- DLS - Espalhamento Dinâmico da Luz, do inglês, Dynamic Light Scattering
- DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica
- ECMO - Oxigenação por membrana extracorpórea
- FDA - Food and Drug Administration
- HEPES - Ácido N-[2-Hidroietil]piperazina-N'-[2- etanosulfônico]
- INFs -Interferons
- Mock - Nanopartícula vazia
- mRNA - RNA Mensageiro
- NSP - Proteínas não estruturais, do inglês, Non-structural proteins
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- ORF- do inglês, Open Reading Frames
- PdI - Índice de Polidispersão
- PEG - Polietilenoglicol
- RBD - Domínio de ligação ao receptor
- RISC - Complexo de Indução de Silenciamento de RNA
- RISC - do inglês, RNA-induced silencing complex
- RNA - Ácido Ribonucleico
- RNAi - RNA de Interferência
- SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
- SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo

siRNA - Small Interfering RNA

SRE - Sistema retículo endotelial

TMPRSS2 - Serina 2 da protease transmembrana celular

TRS - Trato respiratório superior

TTR - Polineuropatia causada por amiloidose por transtirretina

UTI - Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SARS-CoV-2).....	17
2.2	COVID -19	20
2.2.1	Medicamentos	21
2.3	RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	23
2.4	TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	26
2.5	NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS.....	34
4.2	DESENHO DA SEQUÊNCIA DE siRNA.....	34
4.3	PREPARO DAS NANOPARTÍCULA HÍBRIDA CAP-PEG-B-POLI(GLU)- POLIÂNION	35
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	36
4.5	ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO.....	36
4.6	CULTURA CELULAR	36
4.7	ESTUDO <i>IN VITRO</i> : CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES	37
4.8	TESTE DE HEMÓLISE.....	37
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	DESENHO DA SEQUÊNCIA DO siRNA	39
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP- PEG-B-POLI(GLU)-POLIÂNION	40

5.3	ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO NP-siRNA	43
5.4	ESTUDO <i>IN VITRO</i> : CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES	44
5.5	ENSAIO DE HEMÓLISE	46
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 (do inglês, Corona Virus Disease) é uma doença infecciosa causada pelo novo *Betacoronavírus* designado como Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2). Até dezembro de 2022, cerca de 650 milhões de casos foram confirmados e mais de 6,6 milhões de mortes foram relatadas globalmente. Destes, aproximadamente 35 milhões de casos foram confirmados e relacionados a quase 695 mil mortes no Brasil (OMS, 2022). Embora a maioria dos pacientes com COVID-19 não apresente sintomas ou apresente doença leve, cerca de 20% apresentam doença grave e podem ir a óbito. A idade avançada e condições médicas subjacentes são fatores de risco conhecidos para COVID-19 grave (KIM, 2022).

Como outros coronavírus emergentes, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, em cuja superfície apresenta proteínas que emergem em seu envelope (JALAL et al., 2022). O surgimento recente e frequente desses coronavírus altamente patogênicos enfatiza a necessidade de esforços globais conjuntos para a preparação mais adequada para esses desafios, os quais acreditamos que serão recorrentes daqui para frente.

A COVID-19 transformou-se rapidamente em uma pandemia global. Desse modo assim como diagnósticos e vacinas, os medicamentos são ferramentas fundamentais para combater e controlar a doença (KIM, 2022). Atualmente, existem centenas de variantes do SARS-CoV-2 sendo sequenciadas, algumas vacinas foram autorizadas e muitas outras candidatas permanecem em desenvolvimento em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), não há medicamentos exclusivos para tratar a Covid-19. Esse cenário gerou enorme demanda pelo desenvolvimento de antivirais capazes de combater o vírus SARS-CoV-2, e a abordagem de RNA de interferência (RNAi) surgiu como uma possível alternativa nesse contexto. Desde a descoberta, no final da década de 90, o mecanismo de RNAi, que consiste em reprimir com precisão a maioria dos genes, através da correspondência de sequência de bases, tem mostrado um potencial de aplicação evidente (MEDEIROS, et. al., 2021; FIRE et. al., 1998).

Os pequenos RNAs de interferência (do inglês, small interfering RNAs - siRNAs) são encontrados em diversos organismos ou podem ser produzidos sinteticamente para direcionar

um RNA mensageiro (mRNA) específico em células de mamíferos. São conhecidos por guiar o silenciamento de genes específicos de sequências de mRNAs-alvo mediando a clivagem específica do local e, portanto, a destruição do mRNA (HANNON, 2002; LARES, ROSSI; OUELLET, 2010; FIRE et al., 1998).

No entanto, para que esse mecanismo de RNAi ocorra, é necessária uma entrega segura dos ácidos nucleicos aos tecidos alvo. Essa entrega é restringida por múltiplas limitações extracelulares e intracelulares, tornando as aplicações clínicas inviáveis. Assim, estratégias são necessárias para proteger a entrega eficiente dessas moléculas *in vivo* (HU et al., 2020; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

O uso de nanocarreadores para superar as barreiras do uso clínico da terapêutica de RNAi tem sido objeto de diversos estudos (XIN et al., 2017; MERKEL et al., 2009). Neste cenário, nanopartículas cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP) têm sido alvo de estudos. Além da biocompatibilidade dos materiais utilizados na montagem, são capazes de adsorver moléculas polianiónicas, como siRNAs, com eficiência e sem toxicidade, podendo melhorar a farmacocinética, farmacodinâmica e o direcionamento da terapêutica, sendo assim promissoras para entrega eficiente dos ácidos nucleicos. A complexação com um bloco de copolímero polianiónico ao CaP permite controlar o tamanho dos cristais formados durante o processo de síntese. Conseqüentemente, a obtenção de partículas em escala de tamanho nanométrica, adequadas para aplicação clínica é facilitada. Além disso, a utilização do copolímero propicia uma maior estabilidade coloidal, além de evitar a captação pelo sistema monofagocitário, contribuindo para diminuir a imunogenicidade das partículas (ZHANG; LI; HUANG, 2014; ZHANG; KATAOKA, 2009; KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004).

O controle da disseminação da COVID-19 tem sido difícil desde o início da pandemia, e a recente disseminação da variante Omicron apenas amplificou esse desafio, tornando inevitável que o SARS-CoV-2 torne-se um patógeno endêmico na população humana. No entanto, seu impacto em nossa saúde e vida diária mudará consideravelmente ao longo do tempo. Por conta disso, governos e autoridades de saúde pública devem fazer a transição para uma estratégia de longo prazo para lidar com o vírus. Vacinas e terapêuticas específicas, incluindo tratamento ambulatorial para prevenir a progressão da doença, são ferramentas altamente valiosas. No entanto, diante dos níveis de transmissão ainda altos mesmo em áreas

com vacinação generalizada, o controle e impacto epidemiológico desse vírus continuam incertos (KOELLE, 2022).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SARS-COV-2)

Devido ao número crescente de casos de SARS-CoV-2 registrados fora da China em janeiro de 2020, constatou-se que a contenção regional do vírus era altamente improvável, ficando claro que a pandemia global de coronavírus havia começado a se espalhar. Antes da imposição de medidas de bloqueio em Wuhan na China, em 23 de janeiro de 2020, o rápido aumento nos casos de COVID-19 demonstrou a alta eficiência da transmissão de humano para humano do vírus. (KOELLE et al., 2022).

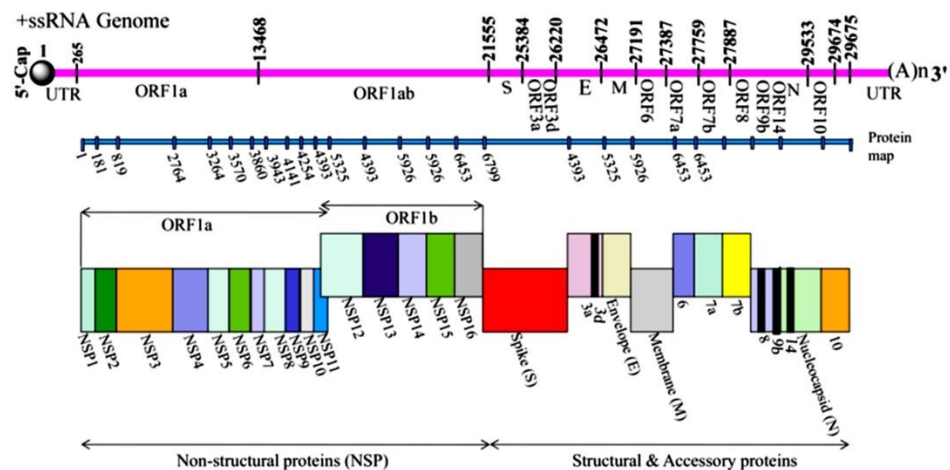
Entre os incontáveis ensinamentos que vivenciamos após o acontecimento da pandemia, a COVID-19 destacou a necessidade de abordagens integradas de saúde global. Uma vez que o aumento da expansão da população humana intensifica o uso de recursos naturais, que frequentemente invadem os habitats de vida selvagem, a criação e o comércio de animais silvestres, a caça e mineração facilitam o contato e transmissão de vírus de interesse pandêmico. As características comuns entre esses vírus emergentes incluem a capacidade de causar doenças graves em humanos, mas não nos hospedeiros reservatórios, raras repercussões apesar de uma ampla distribuição geográfica e o papel potencial dos hospedeiros intermediários que aumentam as oportunidades de infecções humanas. (LETKO et al., 2020; RUIZ-ARAVENA et al., 2022).

Os coronavírus (ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*) incluem quatro gêneros: *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, que infectam uma ampla variedade de mamíferos, e *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, que infectam principalmente aves (RUIZ-ARAVENA et al., 2022). O SARS-CoV-2 é muito semelhante ao SARS-CoV, que foi identificado na China em 2003. Como outros *Betacoronavirus*, o SARS-CoV-2 é um vírus esférico envelopado e contém seu genoma como um RNA de fita simples de sentido positivo. Assim, todas as etapas do ciclo de vida viral ocorrem dentro do citoplasma das células hospedeiras infectadas (KIM, 2022).

No início da infecção, o SARS-CoV-2 tem como alvo as células epiteliais nasais e brônquicas e à medida que a replicação viral acelera, em estágios posteriores da infecção, o vírus infecta diretamente as células endoteliais de vários órgãos, incluindo capilares pulmonares, levando à ruptura da barreira e lesão difusa dos vasos sanguíneos e linfáticos (WIERSINGA et al., 2020; JAHANAFROOZ et al, 2022).

O genoma do SARS-CoV-2 foi estabelecido com aproximadamente 30 kb, incluindo 14 quadros de leitura aberta (do inglês, Open Reading Frames - ORFs), que codificam 29 proteínas. Destas, incluem 16 proteínas não estruturais (NSP1–NSP16) que formam o complexo replicase-transcriptase e 9 proteínas acessórias de um complemento de ORFs 3' (ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c e 10), conforme figura 1 (WU et al., 2020; RAVI, SAXENA, PANDA, 2022).

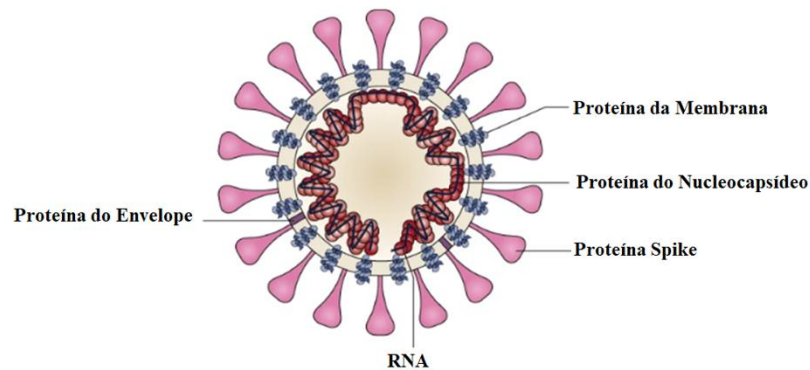
Figura 1 - Organização genômica do SARS CoV2



Fonte: RAVI, SAXENA, PANDA, 2022.

As 4 proteínas restantes são as principais proteínas estruturais típicas, necessárias para regular a função e a estrutura viral, e são elas: a glicoproteína da superfície do pico, ou Spike (S), a proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M), e a proteína do nucleocapsídeo (N) (Figura 2).

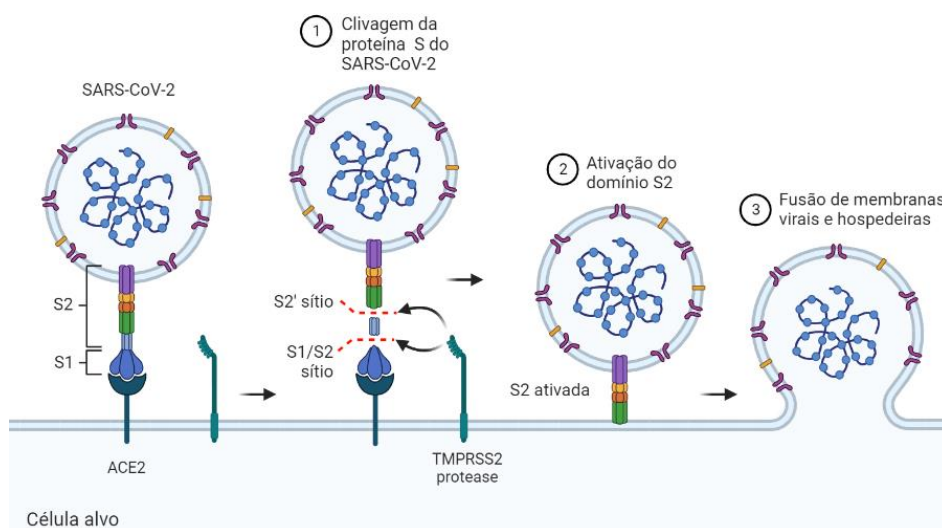
Figura 2 - Proteínas estruturais do SARS-CoV-2



Adaptado de: CUI, LI e SHI, 2019.

Entre essas proteínas estruturais, o pico forma grandes saliências na superfície do vírus, proporcionando aos coronavírus a aparência de coroa, o que sugere o nome (LI, 2017). A proteína Spike é responsável pela entrada do vírus na célula, através do reconhecimento do domínio peptidase da enzima conversora de angiotensina (ACE2) em humanos. O processo de entrada nas células hospedeiras requer dois fatores: I) o domínio de ligação ao receptor (RBD) da unidade de superfície (S1) da proteína S para ligar-se à ACE2, o que favorece a ligação viral à superfície das células hospedeiras; II) a subunidade S2 da proteína S para conduzir o *priming* da proteína S por proteases celulares, que facilita a fusão das membranas viral e celular. Após a ligação do vírus ao ACE2, a junção S1/S2 na proteína S é clivada pela serina 2 da protease transmembrana celular (TMPRSS2), causando o processo de internalização e fusão do vírus à célula hospedeira (HARTENIAN et al, 2020; JAHANAFROOZ et al, 2022), como demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Mecanismo de entrada viral do SARS-COV-2.



Adaptado de: HARTENIAN et al, 2020

Entre todas as proteínas estruturais do SARS-CoV, a proteína S é o principal componente antigênico responsável por induzir respostas imunes do hospedeiro, neutralizar anticorpos e/ou imunidade protetora contra infecção por vírus (DU et al., 2009). A proteína S foi, portanto, selecionada como alvo do presente estudo.

2.2 COVID -19

O pulmão é o principal alvo da infecção por SARS-CoV-2 e o período de incubação entre a exposição ao vírus e o início dos sintomas é de aproximadamente 4 a 5 dias, embora varie entre 2 e 14 dias. A carga viral aumenta à medida que a replicação do vírus continua. Na maioria dos casos, a carga viral diminui como resultado da resposta imune e a pessoa infectada recupera-se espontaneamente sem intervenção terapêutica. No entanto, pessoas com fatores de risco podem sofrer de COVID-19 grave e precisam de tratamento (KIM, 2022).

O vírus levou a milhões de infecções e de mortes em todo o mundo. Os sintomas mais comuns relatados da doença são tosse, expectoração, febre e falta de ar, além disso, foram observados outros conjuntos de sintomas, como os musculoesqueléticos (mialgia, dor articular,

cefaleia e fadiga) e os entéricos (dor abdominal, vômito e diarreia). Alguns fatores de risco foram vinculados ao SARS-CoV-2, como a idade avançada, imunossupressão e comorbidades, bem como hipertensão, diabetes, doenças vasculares, obesidade, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer e a asma. Esses fatores fazem com que o paciente tenha maior probabilidade de desenvolver COVID-19 na forma grave, visto que o risco de uma pessoa contrair uma doença grave por COVID-19 aumenta à medida que aumenta o número de condições médicas subjacentes. Os sintomas podem alternar devido às novas variantes do COVID-19 e em virtude do estado de vacinação do paciente (CDC, 2022).

A COVID-19 pode agravar induzindo complicações que incluem lesão renal aguda, disfunção hepática, cardiomiopatia e disfunção da coagulação. Entre os pacientes hospitalizados, 75% apresentam pneumonia com necessidade de suplementação de oxigênio e 15% têm síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) com insuficiência respiratória hipoxêmica (diminuição de oxigênio do sangue), sendo o principal motivo de internação na unidade de terapia intensiva (UTI) e a principal causa de morte (JAHANAFROOZ et al, 2022).

2.2.1 Medicamentos

Segundo a OMS, não há medicamentos exclusivos para tratar a Covid-19, no entanto, algumas opções medicamentosas já foram aprovadas por meio do uso emergencial. Os tratamentos utilizados atualmente são oriundos de uma lista de pré-qualificação atualizada pela organização. Nessa lista estão medicamentos como Tocilizumab, Dexametasona (fosfato de sódio), Nirmatrelvir + Ritonavir e Remdesivir, além da recomendação de suporte de oxigênio (OMS, 2022).

De acordo com a FDA (do inglês, Food and Drug Administration) existem duas possibilidades de autorização para que um produto possa ser utilizado para a Covid-19. Ao emitir a autorização de uso de emergência, a Agência Federal deve determinar, entre outras coisas, que o produto pode ser eficaz no diagnóstico, tratamento ou prevenção de uma doença ou condição grave ou com risco de vida causada por um agente químico, biológico, radiológico ou nuclear. Deve atestar que os benefícios superam os riscos conhecidos e potenciais do produto. E ainda, que não há alternativas adequadas, aprovadas e disponíveis. Diferentemente da aprovação de novos pedidos de medicamentos, que devem determinar, entre outras coisas,

que o medicamento é seguro e eficaz para uso rotulado e que os benefícios do medicamento superam os riscos. Possuindo controle do processo de fabricação, controle de qualidade e pureza do medicamento. Necessitando de evidência substancial de eficácia (FDA, 2022). A tabela 1 mostra os medicamentos aprovados para o tratamento da COVID-19, de acordo com o FDA.

Tabela 1 - Medicamentos atualmente aprovados para o tratamento da COVID-19

Nome	Justificativa
Veklury (Remdesivir)	Medicamento aprovado para o tratamento de COVID-19 em adultos e pediátricos hospitalizados ou não, que tem sintomas leves a moderados e que correm alto risco de progressão para COVID-19 grave.
Olumiant (baricitinib)	Medicamento aprovado para tratamento de COVID-19 em adultos hospitalizados que necessitam de oxigênio suplementar, ventilação mecânica não invasiva ou invasiva ou oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO)
Bebtelovimabe	Anticorpos produzidos em laboratório que podem ajudar no ataque do sistema imunológico ao SARS-COV-2, bloqueiam a entrada nas células humanas, neutralizando assim o vírus
Evusheld (tixagevimab + cilgavimab)	Anticorpos produzidos em laboratório que podem ajudar no ataque do sistema imunológico ao SARS-COV-2, bloqueiam a entrada nas células humanas, neutralizando assim o vírus
Paxlovid (nirmatrelvir e ritonavir)	Antivirais são medicamentos prescritos (comprimidos, líquidos, pó para inalação ou solução intravenosa) que combatem os vírus
Lagevrio (molnupiravir)	Antivirais são medicamentos prescritos (comprimidos, líquidos, pó para inalação ou solução intravenosa) que combatem os vírus

Kineret (anakinra)	Modulador Imunológico autorizado para o tratamento de COVID-19 em adultos hospitalizados com pneumonia que requerem oxigênio suplementar (oxigênio de baixo ou alto fluxo) que correm o risco de evoluir para insuficiência respiratória grave
Olumiant (baricitinibe)	Modulador Imunológico autorizado para o tratamento de COVID-19 em pacientes pediátricos de 2 a menos de 18 anos de idade que requerem oxigênio suplementar, ventilação mecânica não invasiva ou invasiva, ou oxigênio por membrana extracorpórea (ECMO).

Fonte: Elaboração próprio autor (2022), informações adaptadas FDA (2022).

Os medicamentos para o tratamento da COVID-19 aprovados por meio do uso emergencial aqui no Brasil, são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). São eles: Remdesivir, Sotrovimabe, Baricitinibe, Evusheld®, Paxlovid e o Molnupiravir (ANVISA, 2023).

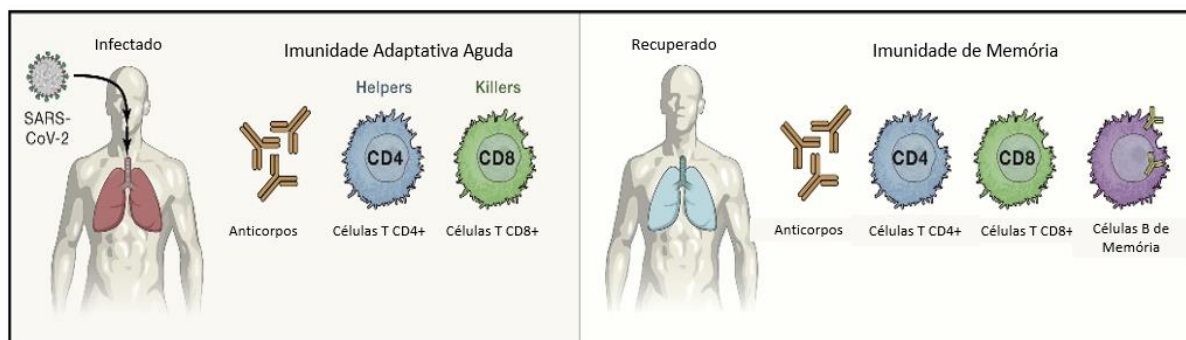
Tendo em vista a limitada quantidade de opções terapêuticas, várias abordagens têm sido sugeridas para controlar as infecções pelo SARS-CoV-2 como: anticorpos monoclonais, peptídeos, interferon, medicamentos, RNA de interferência (RNAi), entre outras. Nesse contexto, em que esforços são necessários para a terapêutica da COVID-19, a abordagem com RNA de interferência vem sendo amplamente estudada como possível tratamento para a doença (MEDEIROS, et al, 2021). Essa situação criou uma grande necessidade de desenvolvimento de medicamentos antivirais capazes de atingir o genoma de RNA do SARS-CoV-2, e a abordagem de interferência de RNA surgiu como uma possível solução, fazendo da proteína S um alvo promissor no desenvolvimento de novas terapêuticas (MURALIDAR et al, 2020).

2.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Compreender os mecanismos imunológicos subjacentes às diferentes manifestações clínicas da COVID-19 é um passo crítico na concepção de estratégias terapêuticas racionais (ARUNACHALAM et al., 2020). Células T CD4 + específicas de vírus, células T CD8 + e anticorpos (produzidos por células B) constituem os três principais componentes da imunidade

adaptativa aguda a uma infecção viral. Já a memória imunológica para uma infecção viral é constituída por quatro principais componentes: células B de memória, anticorpos, células T CD4 + específicas de vírus e células T CD8 + específicas de vírus (SETTE, CROTTY, 2021).

Figura 4 - Principais componentes da imunidade adaptativa nas respostas imunes virais



Fonte: SETTE, CROTTY, 2021

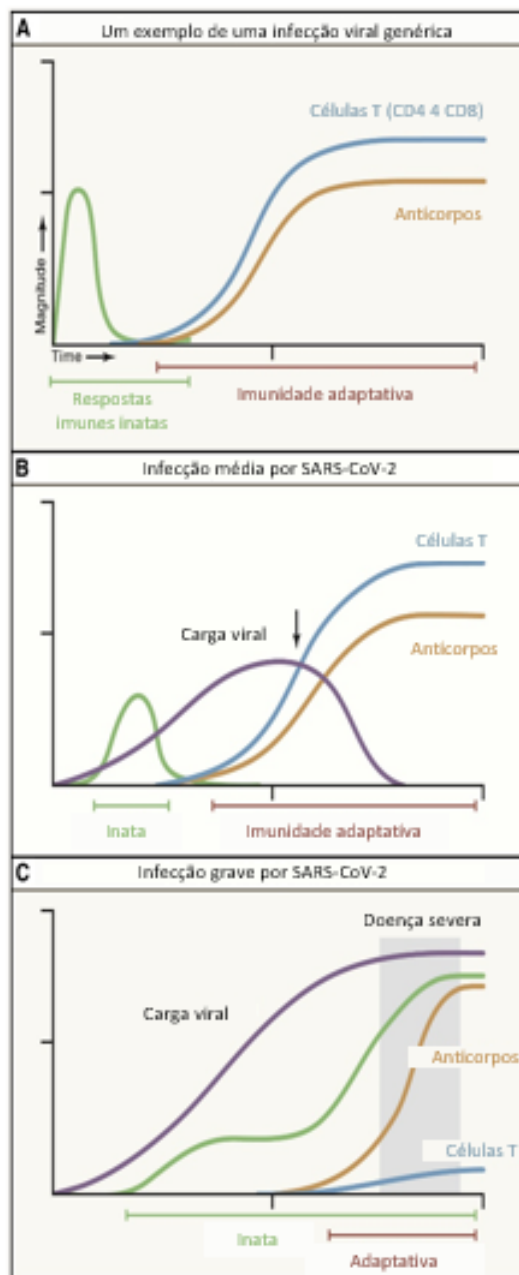
Os três principais componentes da imunidade adaptativa aguda em uma infecção viral são as células T CD4 + específicas do vírus, as células T CD8 + e anticorpos (produzidos por células B). Já a memória imunológica a uma infecção viral consiste em células B de memória, anticorpos, células T CD4 + específicas de vírus e células T CD8 + específicas de vírus.

Em uma infecção por SARS-CoV-2, o vírus é particularmente eficaz em evitar ou retardar o desencadeamento de respostas imunes inatas intracelulares associadas a IFNs tipo I e tipo III (ARUNACHALAM et al., 2020; SETTE, CROTTY, 2021). Sem as respostas imunes, o vírus inicialmente replica-se incessantemente e, igualmente importante, as respostas imunes adaptativas não são ativadas até que ocorram os alarmes imunes inatos. Em casos leves a moderados de COVID-19, o atraso temporal nas respostas imunes inatas é suficiente para resultar em infecção assintomática ou clinicamente leve (ou seja, que não requer hospitalização) porque as respostas das células T e dos anticorpos ocorrem de forma relativamente rápida e controlam a infecção (SETTE, CROTTY, 2021).

Se o atraso da resposta imune inata for muito longo, o que pode ocorrer devido à eficiente evasão do vírus, imunidade inata defeituosa ou uma combinação de ambos, o vírus obtém uma grande vantagem inicial na replicação no trato respiratório superior (TRS) e pulmões, somado a falha em estimular uma resposta imune adaptativa por um longo período, resulta em condições que levam a doença pulmonar grave o suficiente para hospitalização.

Esses fatores podem ser ampliados pelos desafios da idade, visto que indivíduos idosos têm um *pool* menor de células T virgens e, portanto, são mais propensos a lutar para produzir uma resposta rápida de células T que possam reconhecer esse novo vírus (RYDYZNSKI MODERBACHER et al., 2020), o que provavelmente também resulta em respostas de anticorpos neutralizantes prejudicadas, porque as respostas de anticorpos neutralizantes são geralmente dependentes de células T (SETTE, CROTTY, 2021).

Figura 5 - Esquemas conceituais da cinética das respostas imunes ao SARS-CoV-2 e gravidade da doença.



Fonte: SETTE, CROTTY, 2021

Esquemas conceituais da cinética das respostas imunes ao SARS-CoV-2 em condições de COVID-19 médio (casos não hospitalizados) e COVID-19 grave ou fatal. A linha "imunidade inata" refere-se especificamente ao pico cinético de citocinas inatas e quimiocinas detectáveis no sangue; respostas imunes inatas ocorrem localmente durante o curso de uma infecção. "Células T" refere-se a células T CD4 + e CD8 + específicas do vírus. "Anticorpos" refere-se a anticorpos neutralizantes específicos do vírus. As setas indicam um ponto no tempo com diferenças importantes na presença ou ausência de respostas de células T e na magnitude da carga viral, comparando (B) e (C).

(A) Um exemplo de uma infecção viral genérica; (B) Infecção média por SARS-CoV-2; (C) Infecção grave ou fatal por SARS-CoV-2. O período de doença clínica grave de COVID-19 está sombreado em cinza.

É importante ressaltar que este é um modelo em evolução e não deve ser aceito como definitivo; em vez disso, fornece um ponto de referência para interpretar grande parte dos dados disponíveis na literatura e para identificar lacunas de conhecimento que podem fornecer orientações para estudos futuros.

2.4 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA

O silenciamento de genes baseado na interferência de RNA provou ser uma ferramenta importante, que vai além da pesquisa básica. O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) está relacionado a RNAs de fita dupla que mediam a degradação do RNA alvo de maneira específica à sequência. Sendo um processo biológico em que pequenos duplexes de RNA complementares visam e neutralizam moléculas de RNA mensageiro (mRNA) específicas, resultando na inibição da expressão gênica ou tradução genética. Os RNAs interferentes incluem microRNAs e siRNAs, conhecidos como *small interfering RNA*, que geralmente têm cerca de 21 a 27 nucleotídeos de comprimento (KARA, CALIN, OZPOLAT, 2022). A possibilidade de sintetizar quimicamente análogos modificados de siRNAs, capazes de alterar a expressão de genes relacionados à doença ou inibir a expressão de genes de patógenos, torna-se um caminho para uma série de novas opções terapêuticas (LIU et al., 2020).

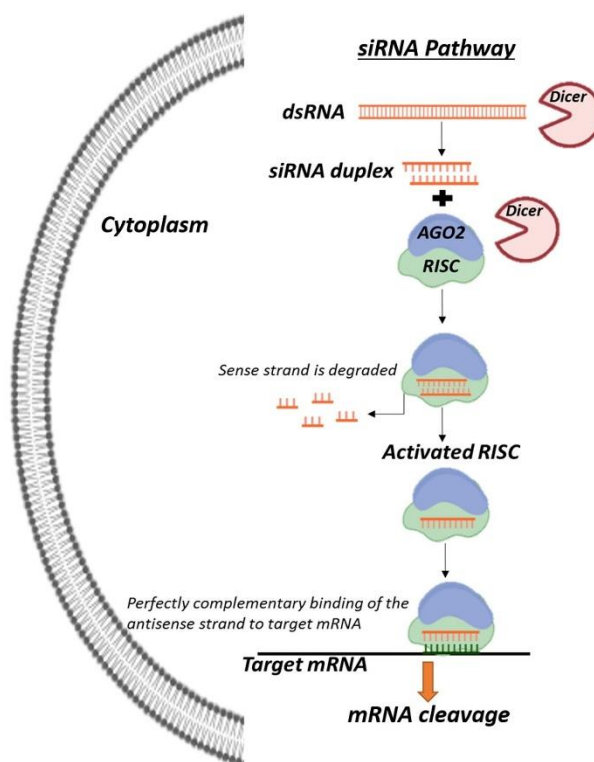
Desde a descoberta do mecanismo de RNAi em 1998, que concedeu a Andrew Fire e Craig Mello o Prêmio Nobel de Fisiologia de 2006 (THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE, 2006), inúmeros estudos sobre o tema são publicados anualmente. Em 2001, Elbashir e seus colaboradores publicaram um artigo que demonstrou o silenciamento de genes *in vitro* em linhagens celulares de mamíferos usando pequenas sequências de RNAi sintéticas contendo 21 nucleotídeos, os siRNAs. Este estudo verificou que a expressão gênica em células

de mamíferos pode ser modulada usando sequências sintéticas de siRNA, sugerindo o potencial terapêutico do uso dessas moléculas (ELBASHIR et al., 2001). Assim tornou-se um método bem conhecido para silenciar/suprimir genes-alvo associados à virulência e patogênese (LIU et al., 2020).

Em 10 de agosto de 2018, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou a primeira terapia de interferência de RNA (RNAi), um tratamento para polineuropatia causada por amiloidose por transtirretina (TTR), chamado de Onpattro (patisiran) da Alnylam Pharmaceuticals (GARBER, 2018). O Pasitiran foi aprovado também pela ANVISA em 2020.

As moléculas de siRNAs, quando no citoplasma, são incorporadas em um complexo de proteínas chamado RISC (do inglês, RNA-induced silencing complex). Uma proteína multifuncional contida no RISC, conhecida como Argonata 2 (AGO2), desenrola as moléculas de siRNA. A fita antisense incorporada ativa o RISC, enquanto a fita sense do siRNA é clivada. O complexo RISC ativado busca e degrada seletiva e especificamente a sequência complementar de mRNA. O complexo RISC ativado busca alvos adicionais ao mRNA, propagando o silenciamento de genes (ELBASHIR et al., 2001; KARA, CALIN, OZPOLAT, 2022). Esse mecanismo é demonstrado na figura 6.

Figura 6 - Mecanismo de silenciamento de genes mediado por siRNA



Adaptado de: KARA, CALIN, OZPOLAT, 2022

A via do RNAi é normalmente desencadeada pela presença de um RNA longo de fita dupla (dsRNA), que é clivado em fragmentos curtos de RNA (os siRNAs) pela enzima Dicer. Uma vez presente no citoplasma da célula, é incorporado a um complexo de proteínas denominado RISC - Complexo de Indução de Silenciamento de RNA. Uma proteína multifuncional desse complexo, Argonata 2, desenrola as moléculas siRNA e a sua fita sense é clivada. O RISC ativado, contendo a fita antisense do siRNA, busca e degrada seletivamente e especificamente a sequência complementar de RNA mensageiro (mRNA).

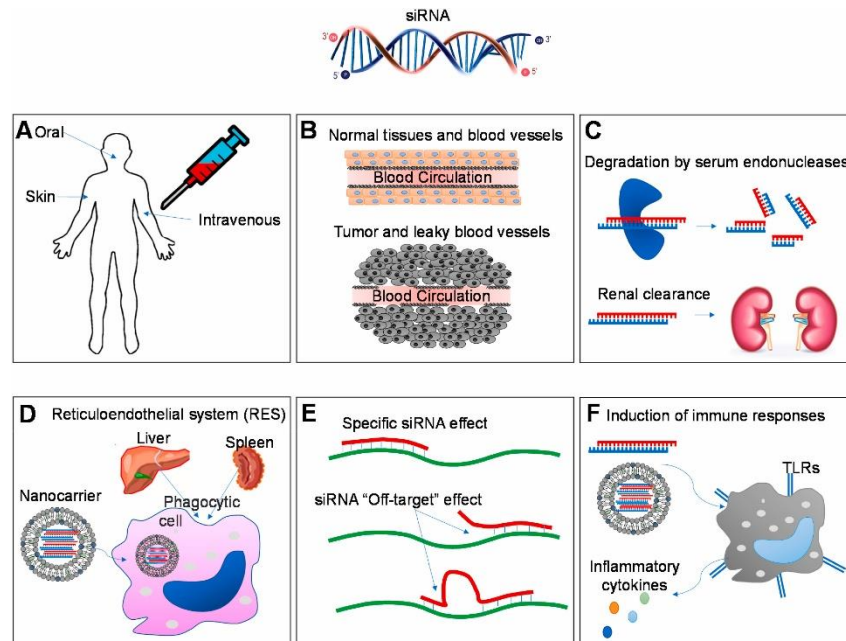
O silenciamento de genes induzido por pequenos siRNA tem sido utilizada com sucesso, como um método eficiente para silenciar genes virais específicos, interromper a síntese proteica e suprimir a replicação do vírus (DU et al., 2009). Assim, a terapia com siRNA é uma ferramenta prospectiva que pode controlar infecções virais humanas pela supressão da expressão do gene viral por meio da hibridização e neutralização do mRNA alvo (CHOWDHURY, et al. 2020). Um estudo de 2004 mostrou que a combinação de sequências de siRNAs para diferentes genes do SARS-CoV foram capazes de reduzir a replicação viral em até 80% (ZHENG, et al 2004). Em 2005, Wu e colaboradores demonstraram que siRNAs direcionados contra o gene Spike e a região 3'UTR foram capazes de inibir a replicação do vírus SARS-CoV em células Vero-E6 (WU et al. 2005). Além disso, um estudo *in vivo*, no qual

foi utilizado um modelo de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), mostrou que o siRNA para o gene S e ORF1b de SARS-CoV proporcionaram redução da febre induzida pela infecção, diminuição da carga viral e redução de lesão pulmonar (LI et al, 2005).

Até o momento, a tecnologia RNAi é relatada como uma ferramenta ideal para inibir a replicação de vírus infecciosos nas células hospedeiras porque o siRNA pode direcionar e silenciar genes importantes do vírus. Em conjunto, outro estudo relata que os vetores de siRNA projetados visando o mRNA da proteína Spike do SARS-CoV poderiam silenciar específica e efetivamente a expressão gênica em células de mamíferos. Este estudo fornece evidências de que o siRNA pode ser empregado como uma ferramenta potencial para inibir a expressão gênica da proteína Spike do SARS-CoV (ZHANG et al., 2004). Nove siRNAs, alvos potencialmente conservados foram identificados através de bioinformática utilizando o genoma SARS-COV-2 (número de acesso GenBank, MN908947.3) para aplicação segura de siRNAs (CHEN et al., 2020). Visando regiões altamente conservadas, os siRNAs Hel1, Hel2, siUC7 e siUTR3 mostraram uma potente interferência na expressão do gene SARS-CoV-2 fornecida por meio de uma nanopartícula lipídica estável (LNP). Portanto, a supressão de proteínas, como a proteína estrutural S do vírus causador da COVID-19, SARS-CoV-2, pela terapia siRNA é uma interessante abordagem para o tratamento e prognóstico de pacientes.

A terapia de silenciamento de genes mediada por siRNA enfrenta desafios em seu caminho até o alvo pretendido. Esses obstáculos resultam em uma diminuição de sua seletividade ou mesmo de sua eficácia quando usados para fins terapêuticos clínicos. Os principais são expostos na figura 7, como: (A) limitação da via de administração, (B) limitação vascular, (C) eliminação sistêmica, (D) destruição pelas células reticuloendoteliais, (E) efeitos fora do alvo e (F) resposta imune e toxicidade (HU et al., 2020; ALSHAER et al., 2021).

Figura 7 – Desafios da terapia de silenciamento de genes mediada por siRNA



Fonte: ALSHAER et al., 2021.

A) limitação da via de administração, (B) limitação vascular, (C) eliminação sistêmica, (D) destruição pelas células reticuloendoteliais, (E) efeitos fora do alvo e (F) resposta imune e toxicidade

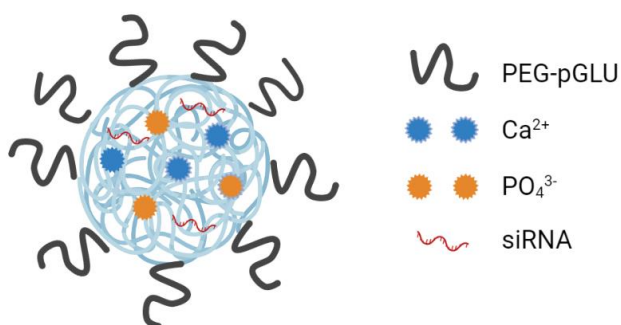
Assim, para que o mecanismo de RNAi ocorra, as moléculas de siRNA devem viajar pela corrente sanguínea e atravessar a membrana celular das células-alvo. As moléculas de siRNAs são hidrofílicas e polianiónicas com alto peso molecular (~ 13 kDa) e, portanto, muito grandes e carregadas negativamente para entrar com sucesso no citoplasma celular. (HU et al., 2020). É importante ressaltar que a administração sistêmica é uma via adequada para o tratamento da COVID-19, uma vez que atinge todos os sistemas do organismo. Encapsular o siRNA em vesículas ou conjugá-lo a certos ligantes pode efetivamente evitar a depuração renal e colaborar com a entrega do siRNA aos tecidos ou células alvo. Desta maneira, como forma de alcançar o efeito terapêutico do siRNA, sistemas nanocarreadores são necessários para a proteção e transporte destas moléculas para o interior da célula (HU et al., 2020; ALSHAER et al., 2021).

2.5 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CaP-PEG-b-poli(GLU)-POLIÂNION

Como consequência das adversidades relacionadas ao caráter intrínseco da molécula, a aplicação do siRNA livre e sem modificações não é apropriada. A instabilidade plasmática, rápido clearance renal e captura pelo sistema fagocitário mononuclear, torna evidente a demanda para a elaboração de estratégias que garantam uma entrega eficaz do ácido nucleico e segura para o uso clínico (XU, WANG, 2015).

Neste contexto, o projeto propõe a utilização de sistemas nanoestruturados constituídos por fosfato de cálcio e copolímero de polietileno(glicol)-poliânion preparado através da auto associação dos componentes (figura 8).

Figura 8 - Ilustração esquemática de uma nanopartículas híbrida CaP-PEG-Poliânion contendo siRNA



Fonte: Próprio autor, 2022

Nanopartículas compostas de fosfato de cálcio inorgânico podem ser empregadas como um sistema de liberação efetiva de matéria genética nas células. É um material acessível financeiramente e biocompatível com capacidade de adsorver moléculas polianiónicas, como o siRNA (PITELLA et al., 2014; SOUZA et al., 2021). Uma alternativa promissora é a complexação de fosfato de cálcio com polietilenoglicol (PEG) neutro e biocompatível para a construção de nanocarreadores eficientes. Esta abordagem é bem elucidada, sendo conhecida por controlar o crescimento de cristais de sal de cálcio, e tem sido aplicada por grupos de estudos (PITELLA et al., 2014, DALMINA et al., 2019; DE MELLO et al., 2017; DE MELLO et al., 2018; CRISTOFOLINI et al., 2020; SOUZA et al., 2021).

Nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP) mostraram-se eficientes na entrega de siRNA em terapias baseadas em silenciamento gênico (PITELLA et al., 2014, DALMINA et al., 2019; DE MELLO et al., 2017; DE MELLO et al., 2018; CRISTOFOLINI et al., 2020; SOUZA et al., 2021). A propriedade amorfa deste material permite a adsorção de ácidos nucleicos, além de ser um material inorgânico sensível ao pH, que é particularmente útil no contexto da superação das barreiras de entrega. No pH ácido endossomal, vesículas nas quais as nanopartículas encontram-se após a internalização celular, o CaP gera um efeito similar a uma "esponja" protônica, aumentando o escape endossomal e permitindo a liberação citosólica do siRNA (BENJAMINSEN et al., 2013). Este efeito é uma característica importante dos polímeros catiônicos para uso como agentes de entrega de genes. Quando um polímero com capacidade de tamponamento de pH entra no endossoma, inicia o tamponamento do compartimento endossômico e resiste na diminuição do pH, levando a um maior influxo de prótons para diminuir o pH. Seguido pelo influxo de íons cloreto e subsequentemente moléculas de água devido à alta concentração iônica. Traduz em alta pressão osmótica, levando ao inchaço e, finalmente, à ruptura do endossomo para liberar seu conteúdo no citosol (BUTT et al., 2022).

As nanopartículas inorgânicas geralmente possuem propriedades versáteis adequadas para entrega celular, incluindo baixa toxicidade e boa compatibilidade, em virtude do CaP ser um constituinte de ossos e dentes (ZHANG; KATAOKA, 2009). No entanto, durante o preparo por auto associação, o crescimento descontrolado de cristais de CaP podem resultar em partículas muito grandes para aplicações biomédicas. A adição de uma camada de PEG-b-poli-ácido glutâmico [PEG-b-poli (GLU)] ao CaP atua como um agente estabilizante, produzindo nanopartículas na escala nanométrica, bem como aumentando a estabilidade coloidal e in vivo destas partículas (DE MELLO et al., 2017).

Este método de preparo já foi padronizado e testado em nosso laboratório, em um estudo realizado por Mello, et al. 2017, onde foi evidenciada a eficiência destas partículas em promover o silenciamento gênico em células de câncer de mama. Após o tratamento com nanopartículas de CaP (NP) contendo 200 nM de siRNA para o gene BCL-2, observou-se a redução da expressão gênica em 51%, além da redução de aproximadamente 60% na expressão da proteína BCL-2 (DE MELLO et al., 2017).

Assim, este projeto visa o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica utilizando siRNAs carregados por nanopartículas, para o silenciamento do gene que codifica a proteína estrutural S do vírus causador da COVID-19, com o objetivo de reduzir a replicação viral utilizando uma linhagem de células Vero E6.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse projeto foi desenvolver uma nova abordagem terapêutica utilizando siRNAs para o silenciamento do gene codificador da proteína estrutural S do vírus SARS-CoV-2, visando diminuir a replicação do vírus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Construir sequência efetiva e específica de siRNA complementar a proteína S do Sars-CoV-2;
- b) Preparar e caracterizar nanopartículas híbridas de CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion contendo siRNA para o silenciamento do gene S, por meio da técnica de auto associação;
- c) Realizar estudos de estabilidade das nanopartículas (NP-siRNA);
- d) Avaliar da citotoxicidade do nanocarreador transportando o siRNA em linhagem celular Vero E6 e C3H – L929 não infectadas;
- e) Investigar potencial hemólise induzida pela formulação de nanopartículas (NP-siRNA);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero E6) e a linhagem de fibroblasto de tecido adiposo de camundongo C3H – L929 foram gentilmente cedidas pela professora Izabella Thaís da Silva, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O meio de cultura Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), azul de tripan, dimetil sulfóxido (DMSO), primers, sequências de siRNA e MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] foram adquiridos da SigmaAldrich® (Missouri, EUA). Soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e tripsina foram obtidas do Cultilab (Campinas, SP). Cloreto de cálcio (CaCl₂), fosfato de sódio tribásico (Na₃PO₄), TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano) e cloreto de sódio serão obtidos da Synth (Diadema, SP). HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico) foi adquirido da Ludwig Biotec (Alvorada, RS). O polímero PEG-b-poli(GLU) foi obtido da Alamanda Polymers, Inc.® (Huntsville, AL, EUA). O clorofórmio, álcool isopropílico, etanol 75 % foram adquiridos de VHTEX (Florianópolis, SC). O kit de detecção ELISA foi adquirido pela Bioclin (Belo Horizonte, MG).

4.2 DESENHO DA SEQUÊNCIA DE siRNA

Para a construção do siRNA do presente estudo, foi realizada busca do genoma completo, no portal NCBI (do inglês, National Center for Biotechnology Information), utilizando no campo de busca 'severe agud respiratory syndrome coronavirus 2' (SARS-CoV-2), aplicando como referência a sequência FASTA do gene S do SARS-CoV-2 isolado Wuhan-Hu-1. Posteriormente à extração das sequências completas dos transcritos primários, foi utilizada a ferramenta Whitehead siRNA Selection Server para o desenho dos siRNAs para o gene S. Em seguida, as estruturas oligonucleotídicas resultantes foram analisadas utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), com a finalidade de reconhecimento das diferentes propriedades estruturais, assim como no que se refere a homologia das sequências obtidas para o gene. Em seguida, foram verificados alguns critérios para seleção da melhor sequência de siRNA conforme descrito por Fakhr e colaboradores (2016). Além disso, foram

avaliadas através da ferramenta Oligoanalyzer ® as propriedades termodinâmicas, que podem favorecer a formação de estruturas secundárias.

4.3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULA HÍBRIDA CAP-PEG-B-POLI(GLU)-POLIÂNION

O preparo das nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion livres de siRNA, nomeadas de *mock*, e contendo o siRNA, nomeadas de NP-siRNA foi realizado em capela de fluxo laminar, através da técnica de *selfassembly*, na qual ocorre a auto associação dos componentes através de interações eletrostáticas, conforme descrito por Kakizawa, Furukawa e Kataoka (2004), com pequenas modificações.

Foram preparadas soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 M (PM = 147,02 g/mol); solução tampão TRIS 10 mM pH 10 (PM = 121,14 g/mol); solução tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7,4; solução tampão HEPES 10 mM pH 7,4 (PM = 238,30 g/mol) e solução HEPES fosfato pH 7,4 contendo HEPES 50 mM, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM e NaCl 140 mM (PM Na_3PO_4 =380,12 g/mol e PM NaCl=58,45 g/mol). O copolímero PEG-b-poli(Glu) foi diluído em solução tampão TRIS na concentração de 1000 µg/mL, enquanto o siRNA foi diluído em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 para concentração de 15 µM

Para a síntese da *mock*, foi realizado o preparo de duas soluções: uma solução aquosa de cloreto de cálcio foi misturada em tampão TRIS pH 10 para formar a solução A. Em outro frasco, foram misturados tampão HEPES-fosfato e solução de PEG-poliânion (1000 µg/mL), para formar a solução B. Ambas as soluções foram misturadas vigorosamente com pipeta, por aproximadamente 20 segundos, para obtenção final da nanopartículas.

Para a síntese da NP-siRNA, foi realizado o preparo de duas soluções: uma solução aquosa de cloreto de cálcio foi misturada em tampão TRIS pH 10 e solução de siRNA para formar a solução A. Em outro frasco, foram misturados tampão HEPES-fosfato e solução de PEG-poliânion (1000 µg/mL), para formar a solução B. Ambas as soluções foram misturadas vigorosamente com pipeta, por aproximadamente 20 segundos, para obtenção final da nanopartículas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Após a síntese das nanopartículas, para a determinação do tamanho e índice de polidispersão (PdI do inglês *polydispersity index*), foi realizada a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) com ângulo detecção de 173° com laser de He-Ne (633 nm) como laser incidente. As medidas foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo (ZEN2112). Os dados obtidos a partir da taxa de decaimento na função de correlação de fótons foram analisados com o método cumulante para obter os diâmetros hidrodinâmicos e os PdIs correspondentes das nanopartículas como descrito por PITTELLA e colaboradores (2011). As medidas foram realizadas a 25°C, sempre após a preparação das nanopartículas.

As suspensões contendo as nanopartículas foram avaliadas quanto ao potencial zeta, colocadas em uma cubeta específica e as medidas foram realizadas também por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), tendo potencial estabelecido de ± 150 mV. A carga superficial das nanopartículas foi estimada pelas medidas de mobilidade eletroforética e o potencial zeta foi calculado medindo a velocidade de migração usando a equação de Smoluchowski, através do software Zetasizer.

4.5 ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

A estabilidade da NP-siRNA foi analisada quanto ao diâmetro hidrodinâmico e PdI nos dias 1, 7, 14 e 21 após a preparação. Foram armazenadas amostras da formulação aliqüotadas em duas diferentes condições, em temperatura ambiente (25°C) e em geladeira (4°C), ambas protegidas da luz.

4.6 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero E6) e a linhagem de fibroblasto de tecido adiposo de camundongo C3H – L929 foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/mL) e 10 mM de tampão HEPES. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂.

4.7 ESTUDO *IN VITRO*: CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

Para o estudo de citotoxicidade das formulações, as células Vero E6 e C3H-L929 foram tratadas em diferentes tempos (24 h e 48 h) e concentrações (0 a 200 nM) com as nanopartículas híbridas *mock* e NP-siRNA, contendo 1000 µg/mL de solução de PEG-poliânion na formulação. A viabilidade celular em resposta a formulação nanoestruturada foi avaliada utilizando o ensaio de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] (MOSMANN, 1983). Primeiramente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços em densidade de 5×10^3 células por poço, em confluência de 90% e incubadas em diferentes tempos e concentrações das formulações *mock* e NP-siRNA. Também foram incubadas células apenas com meio de cultura para controle. Após a incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo 10% de MTT e mantido em estufa por 2 h. Após, o meio contendo MTT foi removido e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais. Após homogeneização dos cristais em agitador orbital por 5 min, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas Microwell Systems® (Organon, Teknika) a 540 nm para determinar a concentração de formazam púrpura, diretamente proporcional à viabilidade celular. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nas demais concentrações foi calculada através de regra de três simples.

4.8 TESTE DE HEMÓLISE

Com o interesse de investigar uma potencial e prejudicial hemólise induzida pela formulação de nanopartículas, a NP-siRNA foram testadas quanto a esse preceito. Para tanto procedeu-se uma coleta de sangue em indivíduo saudável por punção venosa simples. O sangue foi acondicionado em tubos contendo 3,2% de citrato de sódio (anticoagulante). As amostras foram centrifugadas a $200 \times g$, durante 5 min e posteriormente lavadas 3 vezes com solução salina. Os eritrócitos correspondentes a 1 mL de sangue foram ressuspensos em 10 mL de solução salina para formar a solução de eritrócitos. Após, a solução de eritrócitos foi alíquotada em 5 diferentes tubos, contendo 50 µL cada. Para o controle negativo, foi adicionado à solução de eritrócitos apenas solução salina. Para o controle positivo, foi adicionado água. Já nos tubos restantes, foram adicionadas à formulação de NP-siRNA em diferentes concentrações de salina

(1%, 4% e 8%), assim a porcentagem de hemólise foi avaliada pela dosagem de hemoglobina livre no soro, usando o kit de detecção (Bioclin), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Para tanto, as soluções testadas foram incubadas à 37 °C por 1 hora em agitação e a hemólise avaliada por leitura em ELISA (405 nm). O controle positivo foi considerado 100 % de hemólise.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando GraphPad Prism 8, a diferença significativa entre as médias foi analisada pelo Teste t. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENHO DA SEQUÊNCIA DO siRNA

Para obtenção do transcrito primário dos genes da proteína S do SARS-CoV-2, o portal NCBI foi acessado pelo *link* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Os íntrons foram descartados, e os éxons em comum foram selecionados, com objetivo de atingir a melhor inibição de mRNA possível. Com o objetivo de aumentar a probabilidade de obtenção de uma sequência oligonucleotídica eficaz e específica, se faz necessário analisar uma série de requisitos aliados à bioinformática, devido ao fato de que nem todos os siRNAs que apresentam complementariedade aos mRNA respectivos são eficazes (REYNOLDS et al., 2004; FAKHR; ZARE; TEIMOORI-TOOLABI, 2016).

Portanto, as sequências desenhadas através da ferramenta Whitehead siRNA Selection Server foram avaliadas em relação a diversos critérios. Após a utilização do programa e seleção de sequências que tivessem o mínimo de homologias com genes humanos, foram selecionadas 6 sequências complementares promissoras, das 200 sequências complementares para o gene S apontadas pela ferramenta. Assim, o desenho é fundamentado em critérios distintos demonstrados por Fakhr e colaboradores, como percentual de Guanina-Citosina entre 36-52%, conteúdo de nucleotídeo assimétrico no duplex, pareamento de bases, ausência de repetições internas, entre outros. Assim, para a sequência final, foi mantido o percentual 36-52% de Guanina-Citosina, objetivando a garantia de estabilidade devido ao maior número de ligações de hidrogênio entre tais bases nitrogenadas. Ainda, buscou-se a presença de U na 10ª posição da fita sense. Evitou-se repetição de quatro ou mais nucleotídeos, para não haver a formação de estruturas secundárias. Ainda, seguindo os critérios destes autores, os alvos não devem estar localizados nas primeiras 75 bases do códon de início. Ao final, a sequência escolhida foi a localizada em 2938-2960 do mRNA, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de siRNA desenhada para obtenção do transcrito primário dos genes da proteína S do SARS-CoV-2.

Sequência Senso (5' - 3')	Sequência Antisenso (3' - 5')
CCUUUCACGUCUUGACAAA dTdT	GGAAAGUGCAGAACUGUUU

Sequências de siRNA desenhadas para serem incorporadas aos nanocarreadores híbridos

Fonte: Próprio autor (2022).

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP-PEG-B-POLI(GLU)-POLIÂNION

O conhecimento e aplicação da transfecção de ácidos nucleicos por meio de cristais de CaP é uma tecnologia aplicada desde os anos 70 (GRAHAM; VAN DER EB, 1973). A nanotecnologia pode ser utilizada em uma ampla variedade de produtos, incluindo produtos médicos, tendo como uma das vantagens, o aumento da biodisponibilidade. No entanto, o crescimento descontrolado de cristais de CaP podem resultar em partículas grandes para aplicações biomédicas. A precipitação dos íons cálcio e fosfato é um método sujeito à rápida agregação entre os cristais, resultando em partículas de tamanho heterogêneo com eficácia de transfecção variável. Assim, a adição de revestimento de PEG-b-poli (GLU) colabora para o aumento da estabilidade das nanopartículas, sendo capaz de mantê-las em escala nanométrica (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996). Por designação, as nanopartículas são aquelas que apresentam dimensões na faixa de tamanho entre 1 e 100 nm (COMMISSIONER, 2014).

Quando administrados através da via sistêmica, as nanopartículas podem ser captadas por células do sistema imune, como monócitos, leucócitos, plaquetas e células dendríticas, processo que pode ocorrer por opsoninas e precisa ser evitado. Além disso, as propriedades físico-químicas das nanopartículas são importantes, pois dependendo do tamanho e carga superficial, efeitos como hemólise, trombogenicidade e ativação do sistema complemento podem ocorrer, causando toxicidade. O tamanho também é significativo para impedir o confinamento do siRNA no sistema retículo endotelial (SRE) do fígado, baço, pulmão e medula óssea. Um tamanho maior que 100 nm beneficia o reconhecimento pelo SRE. No interior das células, as nanopartículas endocitadas alocam-se nos lisossomos, que contêm nucleases e pH

ácido que degradam RNAs. Portanto, o escape endossomal é importante para garantir o efeito de RNAi (PECOT et al., 2010)

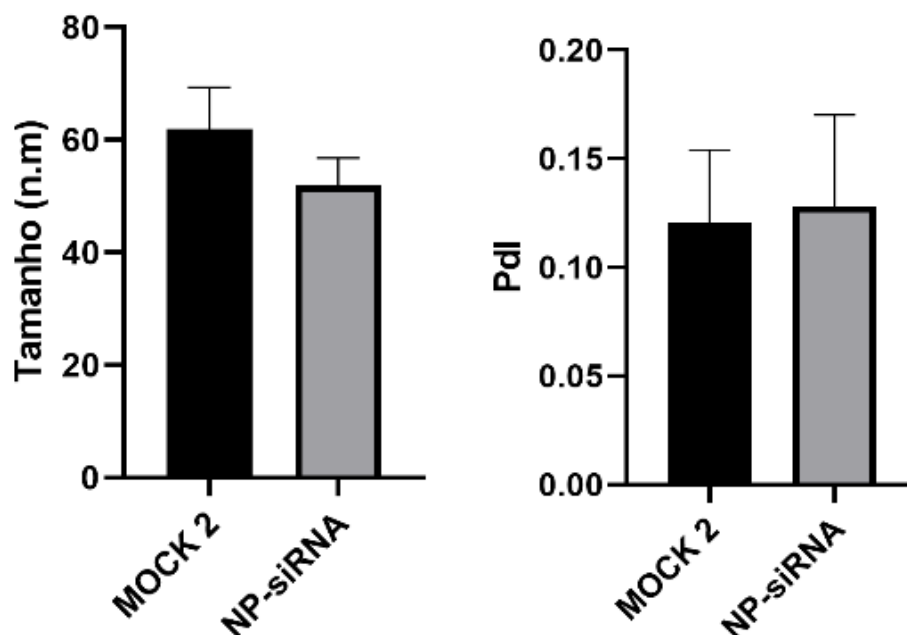
No presente trabalho, a técnica de *self-assembly* foi usada a partir de uma simples mistura estequiométrica de soluções aquosas de CaCl_2 em tris pH 10 na presença de siRNA e PEG-b-poli(Glu) em tampão HEPES-fosfato, que permite a auto associação dos componentes através de interações eletrostáticas, dando origem a um sistema de tamanho controlado e eficaz para transfecção de ácidos nucleicos por nanocarreadores (HABERBECK, 2019; SOUZA, 2021). Além do tamanho, outro aspecto relevante na preparação e aplicação das nanopartículas é a capacidade de distribuição homogênea em solução para a aplicação biológica. Essa particularidade pode ser demonstrada pela análise do PDI, que é a medida da heterogeneidade de nanopartículas em uma mistura. Para a medida de PDI são aceitos parâmetros de 0 a 1 (VERMA; STELLACCI, 2010; HE et al., 2014), porém, quanto mais próximo de 0 mais homogênea a amostra. De acordo com os resultados obtidos, as formulações NP-siRNA e *mock* analisadas, apresentaram média de diâmetros hidrodinâmicos de $52 \text{ nm} \pm 5$ e $61 \text{ nm} \pm 7$; e índice de polidispersão (PDI) de $0,13 \pm 0,04$ e $0,12 \pm 0,03$; respectivamente, como pode-se observar na Tabela 3 e Figura 9.

Tabela 3 - Caracterização das nanopartículas híbridas

Formulação	Tamanho ¹ (d.nm)	PDI ¹
Nanopartícula híbrida NP-siRNA (1000 $\mu\text{g/mL}$ de copolímero)	52 ± 5	$0,13 \pm 0,04$
<i>mock</i> (nanopartículas sem siRNA) (1000 $\mu\text{g/mL}$ de copolímero)	61 ± 7	$0,12 \pm 0,03$

⁽¹⁾ n=3; Nanopartícula híbrida NP-siRNA: Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e sequência de siRNA desenhada; Nanopartícula *mock*; Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 $\mu\text{g/mL}$ livre de siRNA. Todas as medidas foram realizadas a partir da técnica de Dynamic Light Scattering; PDI, índice de polidispersão.
Fonte: Próprio autor (2022).

Figura 9 - Gráficos de comparação do tamanho da nanopartículas e Pdl das formulações *mock* e NP-siRNA.



⁽¹⁾ n=3; Gráfico de comparação entre as formulações. Nanopartícula híbrida NP-siRNA: Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL e sequência de siRNA desenhada; Nanopartícula *mock*; Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL livre de siRNA. Todas as medidas foram realizadas a partir da técnica de Dynamic Light Scattering; Pdl, índice de polidispersão.
Fonte: Próprio autor (2022).

Confrontando os resultados obtidos, os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas são compatíveis com aqueles atingidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa, em que partículas preparadas com a concentração de copolímero de 1000 µg/mL apresentaram tamanho em torno de 53 nm (SOUZA, 2021). Os resultados de tamanho e índice de polidispersão são considerados adequados para realização dos testes *in vitro*. Os resultados demonstram que foi possível preparar as nanopartículas de maneira reprodutível, com baixo custo de produção e com tamanho e índice de polidispersão apropriados.

A carga superficial das nanopartículas, avaliada pelo potencial zeta, foi de $-0,09 \pm 0,02$ mV para NP-siRNA e $-0,03 \pm 0,20$ mV para *mock* (Tabela 4), mantendo-se próximas à neutralidade e sem diferença estatística significativa entre elas.

Tabela 4 - Potencial Zeta das formulações *mock* e NP-siRNA

Formulação	Potencial Zeta ¹ (mV)
NP-siRNA (1000 µg/mL de copolímero)	-0,09 ± 0,02
<i>mock</i> (1000 µg/mL de copolímero)	-0,03 ± 0,20

⁽¹⁾ n=3; Nanopartícula híbrida NP-siRNA: Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL e sequência de siRNA desenhada; Nanopartícula *mock*; Sintetizada com copolímero PEG-b-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL livre de siRNA.

Fonte: Próprio autor (2022).

O conhecimento da carga superficial das nanopartículas é muito relevante para o sistema nano-coloidal. A alta carga superficial, ou seja, valores positivos, levam a repulsão entre as partículas carregadas em dispersão, resultando em alta estabilidade, porém impedindo a agregação devido a repulsão elétrica e ainda levando a elevada citotoxicidade (FRÖHLICH, 2012). Valores negativos, ou próximos a zero são ótimos para uma boa estabilidade da nanodispersão (FREITAS; MULLER, 1998). A notável estabilidade dessas nanopartículas em solução aquosa deve-se também à existência da casca neutra do PEG. O PEG possui uma série de excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, incluindo hidrofiliabilidade, solubilidade em água e solventes orgânicos e ausência de toxicidade. Ainda, diminuem substancialmente a interação com macromoléculas circulantes (VERMA; STELLACCI, 2010).

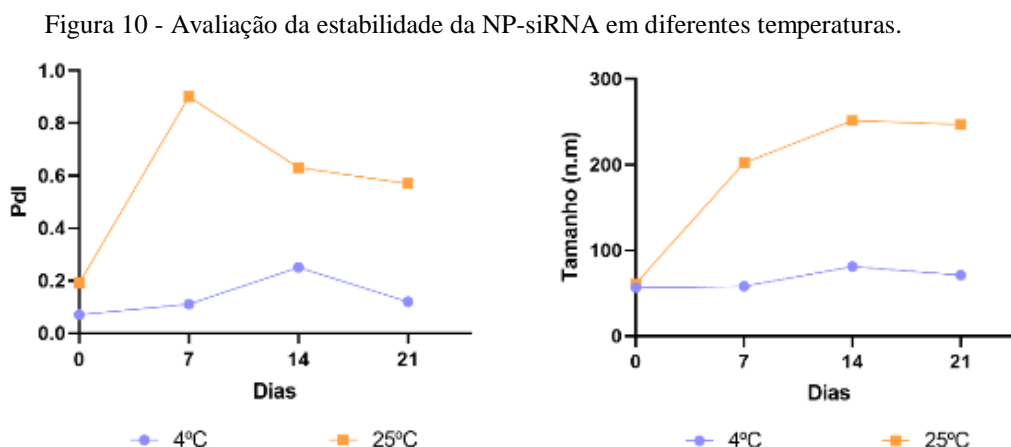
5.3 ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO NP-siRNA

As nanopartículas devem ter como propriedade fundamental a estabilidade, uma vez que essa característica estabelece atributos como biodistribuição, farmacocinética e toxicidade (BORM et al., 2006)

Em suma, a estabilidade das formulações resulta das propriedades de dispersão ou agregação, ou seja, atração ou repulsão. Quando a atração prevalece, ocorre a agregação das partículas, que se aderem e toda a dispersão pode coalescer. Esses fenômenos promovem a

perda da estabilidade, que possivelmente afetará na reprodutibilidade experimental, bem como na toxicidade do material. Em contrapartida, quando as forças de repulsão prevalecerem, conferem ao sistema estabilidade. Outro modo de produzir sistemas estáveis, é a estratégia de revestir as nanopartículas com moléculas poliméricas, que favorecem a estabilidade pelo impedimento estérico (FRITZ et al., 2002; NAPPER, 1983; SHI, 2002).

Assim, o sistema desenvolvido permaneceu estável durante a permanência em geladeira, a 4°C, por 21 dias, em relação ao tamanho e PDI e, também, ao potencial zeta, conforme demonstrado na figura 10. Esses resultados apontam que o copolímero PEG-poliânion, desempenha o papel de controlar o tamanho nanométrico, promovendo a estabilidade coloidal ao sistema. Já em temperatura ambiente, as nanopartículas não apresentaram estabilidade coloidal, sugerindo que o ideal seria o seu armazenamento em temperatura de 4 °C, em prejuízo às variações da temperatura ambiente ou mesmo congeladas a -20°C.



n=3; Em azul: Estabilidade do sistema em temperatura controlada de 4°C; Em laranja: Estabilidade do sistema em temperatura ambiente; Estatística: Teste t.

Fonte: Próprio autor (2022).

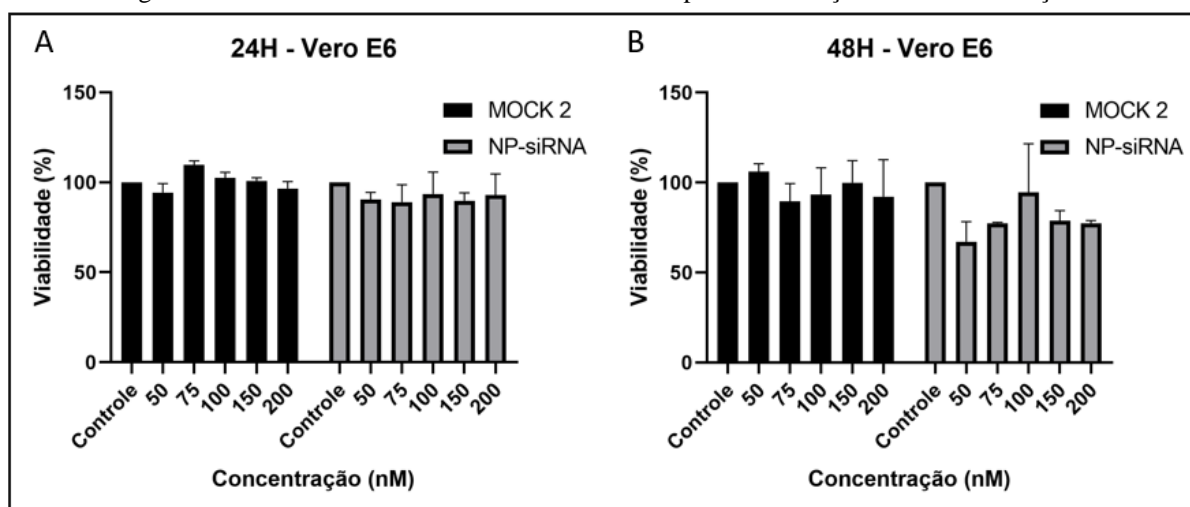
5.4 ESTUDO *IN VITRO*: CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

A linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero E6) e a linhagem de fibroblasto de tecido adiposo de camundongo C3H-L929 foram analisadas pelo ensaio MTT para avaliar o possível efeito citotóxico das formulações.

A linha celular Vero E6, originária do macaco verde africano (*Chlorocebus sp*), é uma linha celular estabelecida e mais amplamente utilizada para estudar a terapêutica contra a infecção por *Betacoronavírus* (KITAMURA et al., 1983; FRIEDRICH et al., 2022). São comumente usadas para isolar, propagar e estudar vírus do tipo SARS-CoV, pois suportam a replicação viral, isso pode ser devido a um alto nível de expressão do receptor ACE-2 que é usado tanto pelo SARS-CoV-2 quanto pelo SARS-CoV e/ou pelo fato de eles não possuírem a capacidade de produzir interferon (GILLIM-ROSS et al., 2004; KAYE et al., 2006; OGANDO et al., 2020).

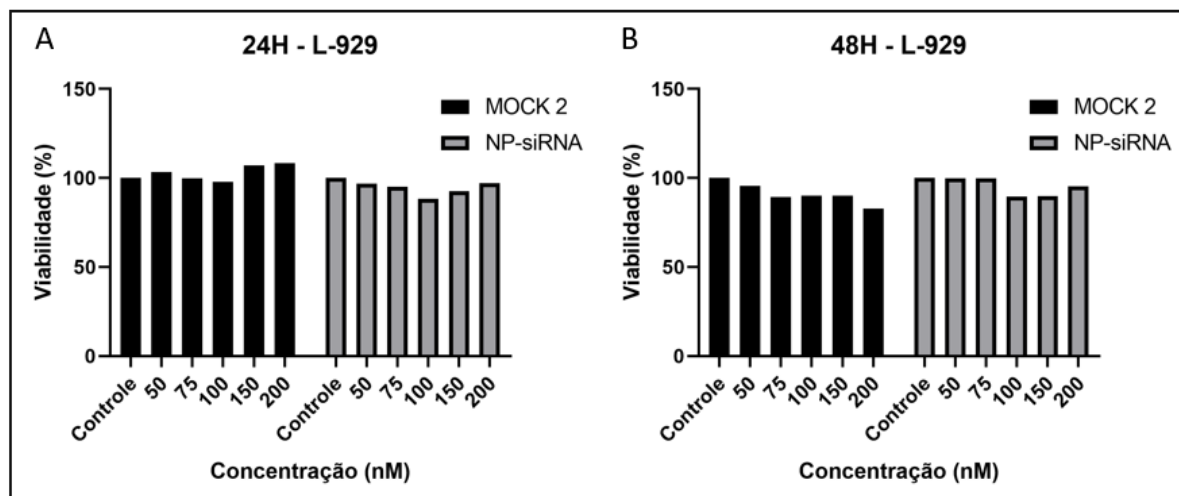
Conforme mostrado nas Figuras 11 e 12, as formulações (*mock* e NP-siRNA) não mostraram citotoxicidade até a concentração de 200 nM, nos tempos de incubação de 24h e 48h. As análises de citotoxicidade sinalizam a biocompatibilidade das formulações, uma vez que a incubação com as células não resultou em efeito citotóxico.

Figura 11 - Viabilidade celular das células Vero E6 após de incubação com as formulações.



n=3; (A) Viabilidade celular das células Vero E6 após 24 horas de incubação com as formulações;
 (B) Viabilidade celular das células Vero E6 após 48 horas de incubação com as formulações. Estatística: Teste t.
 Fonte: Próprio autor (2022).

Figura 12 - Viabilidade celular das células L-929 após de incubação com as formulações.

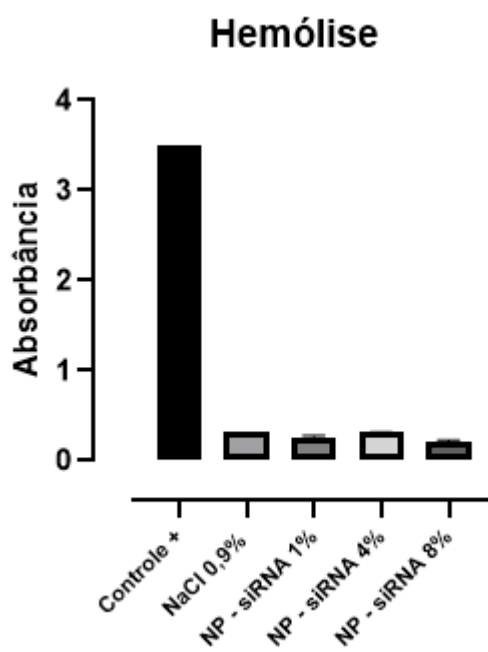


n=2; (A) Viabilidade celular das células L-929 após 24 horas de incubação com as formulações; (B) Viabilidade celular das células L-929 após 48 horas de incubação com as formulações. Estatística: Teste t. Fonte: Próprio autor (2022).

5.5 ENSAIO DE HEMÓLISE

Os ensaios *in vivo* exigem que os componentes dos nanocarreadores não produzam hemólise ao serem colocados em contato com o sangue do paciente. Assim, a formulação NP-siRNA foi incubada com sangue em três diferentes concentrações para avaliação deste parâmetro. A Figura 15 ilustra que não foi observada hemólise em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 13 - Ensaio de hemólise



As hemácias foram incubadas por 1 hora com diferentes concentrações da formulação NP-siRNA. Água destilada foi usada como controle positivo, capaz de causar 100% de hemólise, e a solução de cloreto de sódio 0,9% usada como controle negativo (n=3). Estatística: Teste t.

Fonte: Próprio autor (2022).

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que foi possível preparar nanopartículas com tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta adequados para serem utilizadas na transfecção de siRNA, bem como boa estabilidade e sem apresentar toxicidade para as linhagens celulares testadas. Ainda, um siRNA para o gene S do SARS-CoV-2 foi selecionado seguindo critérios para um desenho eficiente e preciso para o silenciamento gênico. Neste contexto, um sistema nanocarreador foi preparado e caracterizado com sucesso para entrega de material genético, demonstrando reprodutibilidade de síntese. Tem-se como objetivo futuro, avaliar entrega e silenciamento gênico da sequência de siRNA aqui desenhada em células infectadas com o vírus, com o objetivo de verificar a capacidade da formulação de inibir a replicação viral.

REFERÊNCIAS

ALSHAER, WALHAN; ZUREIGAT, HADIL; AL KARAKI, ARWA; ET AL. siRNA: MECHANISM OF ACTION, CHALLENGES, AND THERAPEUTIC APPROACHES. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, v. 905, p. 174178, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0014299921003319](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299921003319)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

ARUNACHALAM, PRABHU S.; WIMMERS, FLORIAN; MOK, CHRIS KA PUN; ET AL. SYSTEMS BIOLOGICAL ASSESSMENT OF IMMUNITY TO MILD VERSUS SEVERE COVID-19 INFECTION IN HUMANS. SCIENCE, v. 369, n. 6508, p. 1210–1220, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCE.ORG/DOI/10.1126/SCIENCE.ABC6261](https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc6261)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

BENJAMINSEN, RIKKE V; MATTEBJERG, MARIA A; HENRIKSEN, JONAS R; ET AL. THE POSSIBLE “PROTON SPONGE ” EFFECT OF POLYETHYLENIMINE (PEI) DOES NOT INCLUDE CHANGE IN LYSOSOMAL PH. MOLECULAR THERAPY, v. 21, n. 1, p. 149–157, 2013. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S1525001616305706](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001616305706)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

BORM, PAUL JA; ROBBINS, DAVID; HAUBOLD, STEPHAN; ET AL. [NO TITLE FOUND]. PARTICLE AND FIBRE TOXICOLOGY, v. 3, n. 1, p. 11, 2006. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://PARTICLEANDFIBRETOXICOLOGY.BIOMEDCENTRAL.COM/ARTICLES/10.1186/1743-8977-3-11](http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-3-11)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

BUTT, ADEEL MASOOD; ABDULLAH, NABIHA; RANI, NUR NAJIHAH IZZATI MAT; ET AL. ENDOSOMAL ESCAPE OF BIOACTIVES DEPLOYED VIA NANOCARRIERS: INSIGHTS INTO THE DESIGN OF POLYMERIC MICELLES. PHARMACEUTICAL RESEARCH, v. 39, n. 6, p. 1047–1064, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://LINK.SPRINGER.COM/10.1007/S11095-022-03296-W](https://link.springer.com/10.1007/s11095-022-03296-w)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CDC. COVID-19 AND YOUR HEALTH. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.CDC.GOV/CORONAVIRUS/2019-NCOV/SYMPTOMS-TESTING/SYMPTOMS.HTML](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CDC. PEOPLE WITH CERTAIN MEDICAL CONDITIONS. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.CDC.GOV/CORONAVIRUS/2019-NCOV/NEED-EXTRA-PRECAUTIONS/PEOPLE-WITH-MEDICAL-CONDITIONS.HTML](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CHEN, WEI; FENG, PENGMIAN; LIU, KEWEI; ET AL. COMPUTATIONAL IDENTIFICATION OF SMALL INTERFERING RNA TARGETS IN SARS-CoV-2. VIROLOGICA SINICA, v. 35, n. 3, p. 359–361, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://LINK.SPRINGER.COM/10.1007/S12250-020-00221-6](https://link.springer.com/10.1007/s12250-020-00221-6)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CHOWDHURY, UMAR FARUQ; SHARIF SHOHAN, MOHAMMAD UMER; HOQUE, KAZI INJAMAMUL; ET AL. A COMPUTATIONAL APPROACH TO DESIGN POTENTIAL siRNA MOLECULES AS A PROSPECTIVE TOOL FOR SILENCING NUCLEOCAPSID PHOSPHOPROTEIN AND SURFACE GLYCOPROTEIN GENE OF SARS-CoV-2. GENOMICS, v. 113, n. 1, p. 331–343, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PMC/ARTICLES/PMC7832576/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7832576/)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

COMMISSIONER, OFFICE OF THE. CONSIDERING WHETHER AN FDA-REGULATED PRODUCT INVOLVES THE APPLICATION OF NANOTECHNOLOGY. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.FDA.GOV/REGULATORY-INFORMATION/SEARCH-FDA-GUIDANCE-DOCUMENTS/CONSIDERING-WHETHER-FDA-REGULATED-PRODUCT-INVOLVES-APPLICATION-NANOTECHNOLOGY](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

COMMISSIONER, OFFICE OF THE. FDA APPROVES FIRST-OF-ITS KIND TARGETED RNA-BASED THERAPY TO TREAT A RARE DISEASE. FDA. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.FDA.GOV/NEWS-EVENTS/PRESS-ANNOUNCEMENTS/FDA-APPROVES-FIRST-ITS-KIND-TARGETED-RNA-BASED-THERAPY-TREAT-RARE-DISEASE](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-its-kind-targeted-rna-based-therapy-treat-rare-disease)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CRISTOFOLINI, TATIANE; DALMINA, MILENE; SIERRA, JELVER A.; ET AL. MULTIFUNCTIONAL HYBRID NANOPARTICLES AS MAGNETIC DELIVERY SYSTEMS FOR siRNA TARGETING THE HER2 GENE IN BREAST CANCER CELLS. MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C, v. 109, p. 110555, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0928493118327371](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118327371)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

CUI, JIE; LI, FANG; SHI, ZHENG-LI. ORIGIN AND EVOLUTION OF PATHOGENIC CORONAVIRUSES. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41579-018-0118-9](https://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

DALMINA, MILENE; PITTELLA, FREDERICO; SIERRA, JELVER ALEXANDER; ET AL. MAGNETICALLY RESPONSIVE HYBRID NANOPARTICLES FOR IN VITRO siRNA DELIVERY TO BREAST CANCER CELLS. MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C, v. 99, p. 1182–1190, 2019. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0928493118326316](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118326316)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

DE MELLO, LEÔNIDAS J.; SOUZA, GABRIELA R. R.; SILVA, ADNY H.; ET AL. IN VIVO ANTIAPOPTOTIC GENE SILENCING: HYBRID NANOPARTICLES AS DELIVERY SYSTEM. IFAC-PAPERSONLINE, v. 51, n. 27, p. 10–15, 2018. (10TH IFAC SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL AND MEDICAL SYSTEMS BMS 2018). DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S2405896318333846](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405896318333846)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

DE MELLO, LEÔNIDAS JOÃO; SOUZA, GABRIELA REGINA ROSA; WINTER, EVELYN; ET AL. KNOCKDOWN OF ANTIAPOPTOTIC GENES IN BREAST CANCER CELLS BY siRNA LOADED INTO HYBRID NANOPARTICLES. NANOTECHNOLOGY, v. 28, n. 17, p. 175101, 2017. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://IOPSCIENCE.IOP.ORG/ARTICLE/10.1088/1361-6528/AA6283](https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/aa6283)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

DU, LANYING; HE, YUXIAN; ZHOU, YUSEN; ET AL. THE SPIKE PROTEIN OF SARS-CoV — A TARGET FOR VACCINE AND THERAPEUTIC DEVELOPMENT. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, v. 7, n. 3, p. 226–236, 2009. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NRMICRO2090](https://www.nature.com/articles/nrmicro2090)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

ELBASHIR, SAYDA M.; HARBORTH, JENS; LENDECKEL, WINFRIED; ET AL. DUPLEXES OF 21-NUCLEOTIDE RNAs MEDIATE RNA INTERFERENCE IN CULTURED MAMMALIAN CELLS. NATURE, v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/35078107](https://www.nature.com/articles/35078107)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

FAKHR, E.; ZARE, F.; TEIMOORI-TOOLABI, L. PRECISE AND EFFICIENT siRNA DESIGN: A KEY POINT IN COMPETENT GENE SILENCING. CANCER GENE THERAPY, v. 23, n. 4, p. 73–82, 2016. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/CGT20164](https://www.nature.com/articles/cgt20164)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

FREITAS, CHRYSANTHA; MÜLLER, RAINER H. EFFECT OF LIGHT AND TEMPERATURE ON ZETA POTENTIAL AND PHYSICAL STABILITY IN SOLID LIPID NANOPARTICLE (SLNTM) DISPERSIONS. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998. DISPONÍVEL EM:

<[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0378517398000921](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517398000921)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

FRIEDRICH, MAIK; PFEIFER, GABRIELE; BINDER, STEFANIE; ET AL. SELECTION AND VALIDATION OF siRNAs PREVENTING UPTAKE AND REPLICATION OF SARS-CoV-2. FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, v. 10, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.FRONTIERSIN.ORG/ARTICLES/10.3389/FBIOE.2022.801870](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.801870)>. ACESSO EM: 31 JAN. 2023.

FRÖHLICH, ELEONORE. THE ROLE OF SURFACE CHARGE IN CELLULAR UPTAKE AND CYTOTOXICITY OF MEDICAL NANOPARTICLES. INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, v. 7, p. 5577–5591, 2012. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PMC/ARTICLES/PMC3493258/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493258/)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

GARBER, KEN. ALNYLAM LAUNCHES ERA OF RNAI DRUGS. NATURE BIOTECHNOLOGY, v. 36, n. 9, p. 777–778, 2018. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NBT0918-777](https://www.nature.com/articles/NBT0918-777)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

GILLIM-ROSS, LAURA; TAYLOR, JILL; SCHOLL, DAVID R.; ET AL. DISCOVERY OF NOVEL HUMAN AND ANIMAL CELLS INFECTED BY THE SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS BY REPLICATION-SPECIFIC MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-PCR. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, v. 42, n. 7, p. 3196–3206, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://JOURNALS.ASM.ORG/DOI/10.1128/JCM.42.7.3196-3206.2004](https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.7.3196-3206.2004)>. ACESSO EM: 31 JAN. 2023.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A NEW TECHNIQUE FOR THE ASSAY OF INFECTIVITY OF HUMAN ADENOVIRUS 5 DNA. VIROLOGY, v. 52, n. 2, p. 456–467, 1973.

HARBECK, NADIA; PENAULT-LLORCA, FRÉDÉRIQUE; CORTES, JAVIER; ET AL. BREAST CANCER. NATURE REVIEWS DISEASE PRIMERS, v. 5, n. 1, p. 1–31, 2019. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41572-019-0111-2](https://www.nature.com/articles/s41572-019-0111-2)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

HARTENIAN, ELLA; NANDAKUMAR, DIVYA; LARI, AZRA; ET AL. THE MOLECULAR VIROLOGY OF CORONAVIRUSES. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0021925817499546](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817499546)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

HE, CHUNBAI; LU, KUANGDA; LIU, DEMIN; ET AL. NANOSCALE METAL–ORGANIC FRAMEWORKS FOR THE CO-DELIVERY OF CISPLATIN AND POOLED siRNAs TO ENHANCE THERAPEUTIC EFFICACY IN DRUG-RESISTANT OVARIAN CANCER CELLS. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, v. 136, n. 14, p. 5181–5184, 2014. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://PUBS.ACS.ORG/DOI/10.1021/JA4098862](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja4098862)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

HU, BO; ZHONG, LIPING; WENG, YUHUA; ET AL. THERAPEUTIC siRNA: STATE OF THE ART. *SIGNAL TRANSDUCTION AND TARGETED THERAPY*, v. 5, n. 1, p. 1–25, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41392-020-0207-X](https://www.nature.com/articles/s41392-020-0207-x)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

IDRIS, ADI; DAVIS, ALICIA; SUPRAMANIAM, AROON; ET AL. A SARS-CoV-2 TARGETED siRNA-NANOPARTICLE THERAPY FOR COVID-19. *MOLECULAR THERAPY*, v. 29, n. 7, p. 2219–2226, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S1525001621002562](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001621002562)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

JAHANAFROOZ, ZOHREH; CHEN, ZHISHAN; BAO, JIANDONG; ET AL. AN OVERVIEW OF HUMAN PROTEINS AND GENES INVOLVED IN SARS-CoV-2 INFECTION. *GENE*, v. 808, p. 145963, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0378111921005588](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111921005588)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

KAKIZAWA, YOSHINORI; FURUKAWA, SANAE; KATAOKA, KAZUNORI. BLOCK COPOLYMER-COATED CALCIUM PHOSPHATE NANOPARTICLES SENSING INTRACELLULAR ENVIRONMENT FOR OLIGODEOXYNUCLEOTIDE AND siRNA DELIVERY. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, v. 97, n. 2, p. 345–356, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0168365904001464](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904001464)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

KARA, GOKNUR; CALIN, GEORGE A.; OZPOLAT, BULENT. RNAI-BASED THERAPEUTICS AND TUMOR TARGETED DELIVERY IN CANCER. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, v. 182, p. 114113, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0169409X22000035](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X22000035)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

KAYE, MATTHEW; DRUCE, JULIAN; TRAN, THOMAS; ET AL. SARS–ASSOCIATED CORONAVIRUS REPLICATION IN CELL LINES. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES*, v. 12, n. 1, p. 128–133, 2006.

DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PMC/ARTICLES/PMC3291385/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291385/)>. ACESSO EM: 31 JAN. 2023.

KIM*, SEUNGTAEK. COVID-19 DRUG DEVELOPMENT. V. 32, N. 1, P. 1–5, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.JMB.OR.KR/JOURNAL/VIEW.HTML?DOI=10.4014/JMB.2110.10029](https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.2110.10029)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

KITAMURA, TAKASHI; KOMATSU, TOSHIHIKO; SUGIYAMA, KAZUYOSHI; ET AL. ISOLATION OF VIRUS CAUSING HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME (HFRS) THROUGH A CELL CULTURE SYSTEM. JAPANESE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE AND BIOLOGY, V. 36, N. 1, P. 17–25, 1983.

KOELLE, KATIA; MARTIN, MICHAEL A.; ANTIA, RUSTOM; ET AL. THE CHANGING EPIDEMIOLOGY OF SARS-CoV-2. SCIENCE, V. 375, N. 6585, P. 1116–1121, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCE.ORG/DOI/10.1126/SCIENCE.ABM4915](https://www.science.org/doi/10.1126/science.abm4915)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

LETKO, MICHAEL; SEIFERT, STEPHANIE N.; OLIVAL, KEVIN J.; ET AL. BAT-BORNE VIRUS DIVERSITY, SPILLOVER AND EMERGENCE. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, V. 18, N. 8, P. 461–471, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41579-020-0394-Z](https://www.nature.com/articles/s41579-020-0394-z)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

LI, BAO-JIAN; TANG, QINGQUAN; CHENG, DU; ET AL. USING siRNA IN PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC REGIMENS AGAINST SARS CORONAVIRUS IN RHESUS MACAQUE. NATURE MEDICINE, V. 11, N. 9, P. 944–951, 2005. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NM1280](https://www.nature.com/articles/nm1280)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

LIU, CYNTHIA; ZHOU, QIONGQIONG; LI, YINGZHU; ET AL. RESEARCH AND DEVELOPMENT ON THERAPEUTIC AGENTS AND VACCINES FOR COVID-19 AND RELATED HUMAN CORONAVIRUS DISEASES. ACS CENTRAL SCIENCE, V. 6, N. 3, P. 315–331, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PMC/ARTICLES/PMC7094090/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094090/)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

MEDEIROS, INÁCIO GOMES; KHAYAT, ANDRÉ SALIM; STRANSKY, BEATRIZ; ET AL. A SMALL INTERFERING RNA (siRNA) DATABASE FOR SARS-CoV-2. SCIENTIFIC REPORTS, V. 11, N. 1, P. 8849, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41598-021-88310-8](https://www.nature.com/articles/s41598-021-88310-8)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

MOSMANN, TIM. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/0022175983903034](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

MURALIDAR, SHIBI; AMBI, SENTHIL VISAGA; SEKARAN, SARAVANAN; ET AL. THE EMERGENCE OF COVID-19 AS A GLOBAL PANDEMIC: UNDERSTANDING THE EPIDEMIOLOGY, IMMUNE RESPONSE AND POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS OF SARS-CoV-2. *BIOCHIMIE*, v. 179, p. 85–100, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0300908420302248](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908420302248)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

NAPPER, DONALD H. COLLOID STABILITY. *PRODUCT R&D*, v. 9, n. 4, p. 467–477, 1970. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://PUBS.ACS.ORG/DOI/ABS/10.1021/i360036a005](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i360036a005)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

OGANDO, NATACHA S.; DALEBOUT, TIM J.; ZEVENHOVEN-DOBBE, JESSIKA C.; ET AL. SARS-CORONAVIRUS-2 REPLICATION IN VERO E6 CELLS: REPLICATION KINETICS, RAPID ADAPTATION AND CYTOPATHOLOGY. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, v. 101, n. 9, p. 925–940, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.MICROBIOLOGYRESEARCH.ORG/CONTENT/JOURNAL/JGV/10.1099/JGV.0.001453](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001453)>. ACESSO EM: 31 JAN. 2023.

PECOT, CHAD V.; CALIN, GEORGE A.; COLEMAN, ROBERT L.; ET AL. RNA INTERFERENCE IN THE CLINIC: CHALLENGES AND FUTURE DIRECTIONS. *NATURE REVIEWS CANCER*, v. 11, n. 1, p. 59–67, 2011. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NRC2966](https://www.nature.com/articles/nrc2966)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

PITTELLA, FREDERICO; CABRAL, HORACIO; MAEDA, YOSHINORI; ET AL. SYSTEMIC siRNA DELIVERY TO A SPONTANEOUS PANCREATIC TUMOR MODEL IN TRANSGENIC MICE BY PEGYLATED CALCIUM PHOSPHATE HYBRID MICELLES. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, v. 178, p. 18–24, 2014. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S016836591400025X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836591400025X)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

PITTELLA, FREDERICO; ZHANG, MINGZHEN; LEE, YAN; ET AL. ENHANCED ENDOSOMAL ESCAPE OF siRNA-INCORPORATING HYBRID NANOPARTICLES FROM CALCIUM PHOSPHATE AND PEG-BLOCK CHARGE-CONVERSIONAL POLYMER FOR EFFICIENT GENE KNOCKDOWN WITH NEGLIGIBLE

CYTOTOXICITY. *BIOMATERIALS*, v. 32, n. 11, p. 3106–3114, 2011. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0142961210016303](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210016303)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

RAVI, V.; SAXENA, SONAL; PANDA, PRAGYAN SWAGATIKA. BASIC VIROLOGY OF SARS-CoV 2. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*, v. 40, n. 2, p. 182–186, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S025508572200041X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025508572200041X)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

RESEARCH, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND. CORONAVIRUS (COVID-19) | DRUGS. FDA. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.FDA.GOV/DRUGS/EMERGENCY-PREPAREDNESS-DRUGS/CORONAVIRUS-COVID-19-DRUGS](https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

REYNOLDS, ANGELA; LEAKE, DEVIN; BOESE, QUETA; ET AL. RATIONAL siRNA DESIGN FOR RNA INTERFERENCE. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, v. 22, n. 3, p. 326–330, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NBT936](https://www.nature.com/articles/nbt936)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

RUIZ-ARAVENA, MANUEL; MCKEE, CLIFTON; GAMBLE, AMANDINE; ET AL. ECOLOGY, EVOLUTION AND SPILLOVER OF CORONAVIRUSES FROM BATS. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, v. 20, n. 5, p. 299–314, 2022. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41579-021-00652-2](https://www.nature.com/articles/s41579-021-00652-2)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

RYDYZNSKI MODERBACHER, CAROLYN; RAMIREZ, SYDNEY I.; DAN, JENNIFER M.; ET AL. ANTIGEN-SPECIFIC ADAPTIVE IMMUNITY TO SARS-CoV-2 IN ACUTE COVID-19 AND ASSOCIATIONS WITH AGE AND DISEASE SEVERITY. *CELL*, v. 183, n. 4, p. 996-1012.E19, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0092867420312356](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420312356)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

SCHWARZ, DIANNE S.; HUTVÁGNER, GYÖRGY; DU, TINGTING; ET AL. ASYMMETRY IN THE ASSEMBLY OF THE RNAi ENZYME COMPLEX. *CELL*, v. 115, n. 2, p. 199–208, 2003. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.CELL.COM/CELL/ABSTRACT/S0092-8674\(03\)00759-1](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(03)00759-1)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

SETTE, ALESSANDRO; CROTTY, SHANE. ADAPTIVE IMMUNITY TO SARS-CoV-2 AND COVID-19. *CELL*, v. 184, n. 4, p. 861–880, 2021. DISPONÍVEL EM:

<[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0092867421000076](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867421000076)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

SOUZA, GABRIELA REGINA ROSA; DALMINA, MILENE; RESTREPO, JELVER ALEXANDER SIERRA; ET AL. SHORT INTERFERING RNA DELIVERED BY A HYBRID NANOPARTICLE TARGETING VEGF: BIODISTRIBUTION AND ANTI-TUMOR EFFECT. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS*, v. 1865, n. 9, p. 129938, 2021. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0304416521000969](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416521000969)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

VERMA, AYUSH; STELLACCI, FRANCESCO. EFFECT OF SURFACE PROPERTIES ON NANOPARTICLE-CELL INTERACTIONS. *SMALL*, v. 6, n. 1, p. 12–21, 2010. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://ONLINELIBRARY.WILEY.COM/DOI/10.1002/SML.200901158](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.200901158)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

WIERSINGA, W. JOOST; RHODES, ANDREW; CHENG, ALLEN C.; ET AL. PATHOPHYSIOLOGY, TRANSMISSION, DIAGNOSIS, AND TREATMENT OF CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19): A REVIEW. *JAMA*, v. 324, n. 8, p. 782, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://JAMANETWORK.COM/JOURNALS/JAMA/FULLARTICLE/2768391](https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

WU, CHANG-JER; HUANG, HUI-WEN; LIU, CHIU-YI; ET AL. INHIBITION OF SARS-CoV REPLICATION BY siRNA. *ANTIVIRAL RESEARCH*, v. 65, n. 1, p. 45–48, 2005. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0166354204002220](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354204002220)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

WU, FAN; ZHAO, SU; YU, BIN; ET AL. A NEW CORONAVIRUS ASSOCIATED WITH HUMAN RESPIRATORY DISEASE IN CHINA. *NATURE*, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41586-020-2008-3](https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

XU, CONG-FEI; WANG, JUN. DELIVERY SYSTEMS FOR siRNA DRUG DEVELOPMENT IN CANCER THERAPY. *ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S1818087614000646](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000646)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

ZHANG, JING; LI, XIANG; HUANG, LEAF. NON-VIRAL NANOCARRIERS FOR siRNA DELIVERY IN BREAST CANCER. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, v. 190, p. 440–450, 2014. (30TH ANNIVERSARY

SPECIAL ISSUE). DISPONÍVEL EM:
<[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S016836591400340X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836591400340X)>. ACESSO EM:
16 JAN. 2023.

ZHANG, MINGZHEN; KATAOKA, KAZUNORI. NANO-STRUCTURED COMPOSITES BASED ON CALCIUM PHOSPHATE FOR CELLULAR DELIVERY OF THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC AGENTS. NANO TODAY, v. 4, N. 6, p. 508–517, 2009. DISPONÍVEL EM:
<[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S1748013209001200](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013209001200)>. ACESSO EM:
16 JAN. 2023.

ZHANG, YUANJIANG; LI, TIESHI; FU, LING; ET AL. SILENCING SARS-CoV SPIKE PROTEIN EXPRESSION IN CULTURED CELLS BY RNA INTERFERENCE. FEBS LETTERS, v. 560, N. 1, p. 141–146, 2004. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0014579304000870](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579304000870)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

ZHENG, BO-JIAN; GUAN, YI; TANG, QINGQUAN; ET AL. PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC EFFECTS OF SMALL INTERFERING RNA TARGETING SARS-CORONAVIRUS. ANTIVIRAL THERAPY, v. 9, N. 3, p. 365–374, 2004.

THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2006. NOBELPRIZE.ORG. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.NOBELPRIZE.ORG/PRIZES/MEDICINE/2006/SUMMARY/](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/)>. ACESSO EM: 16 JAN. 2023.

MEDICAMENTOS APROVADOS. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. DISPONÍVEL EM:<[HTTPS://WWW.GOV.BR/ANVISA/PTBR/ASSUNTOS/PAF/CORONAVIRUS/MEDICAMENTOS/MEDICAMENTOS-APROVADOS](https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos/medicamentos-aprovados)>. ACESSO EM: 17 FEV. 2023.