

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA**

Edroaldo Lummertz da Rocha

**INTERAÇÕES NANOPARTÍCULA-CÉLULAS E  
BIOMATERIAL-CÉLULAS INDUZEM MUDANÇAS GLOBAIS EM  
PROGRAMAS DE EXPRESSÃO DE GENES**

Florianópolis

2014



Edroaldo Lummertz da Rocha

**INTERAÇÕES NANOPARTÍCULA-CÉLULAS E  
BIOMATERIAL-CÉLULAS INDUZEM MUDANÇAS GLOBAIS EM  
PROGRAMAS DE EXPRESSÃO DE GENES**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Ciência e Engenharia de Materiais para  
a obtenção do Grau de Doutor.

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina:

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo

Coorientador

Universidade Federal de Santa Catarina:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Florianópolis

2014

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

Rocha, Edroaldo Lummertz da  
Interações Nanopartícula-Células e Biomaterial-Células  
Induzem Mudanças Globais em Programas de Expressão de Genes  
/ Edroaldo Lummertz da Rocha ; orientador, Carlos Renato  
Rambo ; coorientador, Luismar Marques Porto. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais.

Inclui referências

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2.  
Nanotecnologia. 3. Biologia Computacional. 4. Câncer. 5.  
Células-tronco. I. Rambo, Carlos Renato. II. Porto,  
Luismar Marques. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia  
de Materiais. IV. Título.

Edroaldo Lummertz da Rocha

**INTERAÇÕES NANOPARTÍCULA-CÉLULAS E  
BIOMATERIAL-CÉLULAS INDUZEM MUDANÇAS GLOBAIS EM  
PROGRAMAS DE EXPRESSÃO DE GENES**

Esta Tese foi julgada aprovada para a obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Florianópolis, 23 de Setembro 2014.

---

Prof. Dr. Antônio Pedro Novaes de Oliveira  
Coordenador  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Tania Beatriz Creczynski Pasa  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Andréa Gonçalves Trentin  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Lygia da Veiga Pereira  
Universidade de São Paulo

---

Frederico Pittella Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, Maria e Eriovaldo, Ao meu  
irmão, Adriano, À minha esposa, Alessandra.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais Maria Aparecida e Eriovaldo e ao meu irmão Adriano, que são as pessoas que amo nessa vida, que lutaram junto comigo nesta e em muitas outras etapas.

Com muito amor, agradeço a minha esposa Alessandra por estar ao meu lado desde o início da minha trajetória como cientista, durante o período da graduação até o término do doutorado e nas próximas etapas por vir, me dando todo o amor e compreensão.

Ao meu orientador Carlos Renato Rambo, minha gratidão pela dedicação, paciência e amizade. Ao meu coorientador Luismar Marques Porto.

Aos amigos que nos acolheram em Boston, nos Estados Unidos, durante o doutorado sanduíche, Edmilson Militão, Lucas Militão, Sheba Telore, Ramesh Telore e Mabel Telore.

Aos amigos que caminharam junto comigo nestes quatro anos Daliana Muller, Fernanda Berti, Júlia Vasconcellos, Cássio Almeida, Genevieve Pinheiro.

Ao professor Giovanni F. Caramori (UFSC), Pedro H. C. Camargo (USP) por disponibilizarem a infra-estrutura de seus laboratórios para a realização de parte deste trabalho .

Gostaria de agradecer também aos professores e à Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pelas oportunidades e lições ensinadas em todo o caminho que percorri.

Agradeço ao Rogério Antônio Campos, secretário do PGMAT, por toda a ajuda prestada.

Agradeço ao professor Donald E. Ingber e Kenny Roberts por me aceitarem para realizar o meu doutorado sanduíche em uma das melhores e mais respeitadas instituições de ensino e pesquisa do mundo, a Universidade de Harvard. Agradeço aos amigos de laboratório do Wyss Institute/Harvard Anne-Laure Papa, Denis Yuksel, Mathumai Kanapathipillai, Netanel Korin, Steven Perrault, Philip Snell e Sauveur Jeanty assim como Itay Tirosh (Broad Institute, Harvard/MIT). O meu muito obrigado.

Agradeço os professores da Harvard, George Q. Daley e James J. Collins pela excelente oportunidade de aprendizado e pesquisa que obtive em seus laboratórios. Agradeço aos post-docs Patrick Cahan, Hu Li e Samantha Morris, com quem trabalhei durante meu período na Harvard e que contribuíram significativamente com a minha formação acadêmica além de terem se tornado ótimos amigos.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro e ao programa Ciência sem Fronteiras/CNPq pela oportunidade de estudar no exterior.



"We're not here because we love biology, We're here because we love biology as it serves mankind."

(Bert Vogelstein, 2013)



## RESUMO

Esta tese apresenta uma série de investigações e resultados na interface entre ciência dos materiais, ciência da computação e biologia, em que, primeiramente, interações nanopartícula-célula foram estudadas utilizando simulações de dinâmica molecular, buscando compreender aspectos físico-químicos da interface existente entre nanomateriais e células. A partir destes estudos, logo ficou evidente que novos métodos para estudar estas interações, assim como interações biomaterial-célula, seriam necessários. Neste sentido, uma abordagem baseada em biologia de sistemas (CellNet) foi utilizada para elucidar mudanças globais em programas de expressão de genes em células interagindo com nanopartículas ou cultivadas em culturas de células organóides. Estes métodos foram primeiramente desenvolvidos e validados para área de células-tronco, especificamente para experimentos de engenharia de identidade celular, tais como reprogramação de células somáticas para um estado de pluripotência induzida, diferenciação dirigida de células-tronco pluripotentes para tipos de células específicos (cardiomiócitos) e conversão direta entre células somáticas (fibroblastos para cardiomiócitos). Aplicação de CellNet para interações nanopartícula-célula indicou que mudanças transcricionais significativas podem ocorrer, tal como quantificado pelo estabelecimento de redes reguladoras de genes (GRN) em células do sistema imune incubadas com nanopartículas de ouro, funcionalizadas com oligonucleotídeos. Além disso, respostas inflamatórias podem estar associadas a estas interações, uma vez que genes regulando vias de sinalização mediadas por interferon são super expressos. Análise de queratinócitos humanos em plataformas de cultura celular organóides mostrou o estabelecimento completo da GRN da pele e que existem diferenças significativas no transcriptoma de células cultivadas em plataformas bidimensionais e tridimensionais. Nanopartículas ativáveis por processos de remodelagem da matriz extracelular foram desenvolvidas e caracterizadas, onde se verificou que a ativação por proteases específicas tais como MMP9/2 e uPA é possível, juntamente com a aparente inibição da atividade da enzima catepsina B, sugerindo uma abordagem terapêutica plausível para tumores apresentando padrões de super expressão de MMP9/2 e catepsina B. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento de interações nanomaterial/biomaterial-célula e o projeto de nanopartículas terapêuticas, assim como melhor entendimento sobre os três principais paradigmas de engenharia celular atualmente amplamente utilizados.

**Palavras-chave:** Dinâmica molecular. Biologia computacional. Nanomateriais. Biomateriais. Câncer. Células-tronco.



## ABSTRACT

This thesis presents investigations and results at the interface between materials science, computer science and biology where nanoparticle-cell interactions were studied using molecular dynamics simulations, aiming at understanding physical-chemical aspects of the interface existing between nanomaterials and cells. From these studies was evident that new methods to study such interactions as well as biomaterial-cell interactions would be required. Thus, an approach based on systems biology (CellNet) was used to elucidate global changes in gene expression programs in cells interacting with nanoparticles or cultured in organoid cell cultures. Firstly, these methods were developed and validated for stem cells, specifically to the engineering of cell identity such as reprogramming of somatic cells to pluripotency, directed differentiation of stem cells to specific lineages (such cardiomyocytes) and direct conversion between somatic cells (fibroblasts to cardiomyocytes). CellNet application to nanoparticle-cell interactions showed that significant transcriptional changes may occur as quantified by the establishment of Gene Regulatory Networks (GRNs) in immune system cells incubated with gold nanoparticles functionalized with oligonucleotides. In addition, inflammatory responses might be associated as suggested by the upregulation of genes regulating interferon-mediated signaling pathways. Analysis of human keratinocytes in organoid cell culture indicated the full establishment of the skin GRN and that there are major differences between cells cultured in bidimensional and tridimensional platforms at the transcriptome level. Nanoparticles activated by extracellular matrix remodelling processes were developed and characterized, where it was demonstrated that activation by specific proteases such as MMP9 and MMP2 is possible as well as an unclear effect on the inhibition of Cathepsin B by nanoparticles, suggesting a therapeutic strategy for cancers showing upregulation of MMP9, MMP2 and cathepsin B. The results presented contribute to a better understanding of nanoparticle/biomaterial-cell interactions, the design of therapeutic nanomaterials as well as a better understanding regarding the three major cell engineering paradigms widely used.

**Keywords:** Molecular Dynamics. Computational Biology. Nanomaterials. Biomaterials. Cancer. Stem cells.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	As principais contribuições desta tese abrangem as áreas de ciência dos materiais, ciência da computação e biologia computacional. .	34
Figura 2	Artigo de capa da revista PCCP (ROCHA; CARAMORI; RAMBO, 2013).....	35
Figura 3	<i>Snapshots</i> das interações de nanopartículas de ouro com diferentes químicas de superfície e dois tipos de bicamadas lipídicas. Bicamadas lipídicas nas figuras (a), (c) e (e) são aniônicas (lipídeos DPPC/DPPG) e estão interagindo com nanopartículas catiônicas, hidrofóbicas e aniônicas, respectivamente. Nas figuras (b), (d) e (f), estas nanopartículas estão interagindo com a bicamada lipídica neutra (DPPC). Cores: headgroups dos lipídeos DPPC são mostrados em azul com as "caudas" vspace1mm mostradas em verde. Para os lipídeos DPPG, tanto dos headgroups quanto as "caudas" estão em branco. Átomos de ouro na nanopartícula são mostrados em amarelo e ligantes em vermelho. Íons $NA^+$ and $CL^-$ estão em <i>ochre</i> e amarelo, respectivamente. ....	40
Figura 4	Interações de nanopartículas de ouro com diferentes recobrimentos de superfície catiônicos e bicamadas lipídicas negativas. (a), (b), (c), (d) e (e) mostram visualizações da seção cruzada dos sistemas nanopartícula-membrana com densidades de carga de 20, 40, 60, 80 e 100%. (f), (g), (h), (i) e (j) mostram visões do topo destes sistemas.....	43
Figura 5	Propriedades estruturais das membranas como uma função da densidade de carga. (a) Áreas defeituosas induzidas pela nanopartícula com diferentes densidades de carga de superfície, (b) "Encolhimento" da membrana durante os processos adsorção e rompimento/empacotamento, (c) o erro médio quadrático entre a membrana equilibrada e a membrana interagindo com a nanopartícula. (d) Reorganização de lipídeos como medido por parâmetros de ordem médio.....	44
Figura 6	Funções de distribuição radial entre lipídeos DPPC, DPPG, água e a nanopartícula de ouro. (a) apresenta RDFs para nanopartículas com 20% de carga. (b) RDFs para nanopartículas com 100% de carga. . .	46
Figura 7	Efeito do comprimento do ligante e carga de superfície em interações nanopartícula-célula. (a), (b) e (c) apresentam nanopartículas com 20% de carga e ligantes 1-octanotiol, 1-dodecanotiol e 1-hexadecanotiol, respectivamente. (d), (e) e (f) mostram nanopartículas com 100% de carga e os mesmos ligantes previamente citados. (g), (h) e (i) mostram funções de distribuição radial entre os terminais catiônicos da nanopar-	

tícula e grupos negativamente carregados da membrana. Insets mostram RDFs para os terminais catiônicos da nanopartícula e grupos positivamente carregados da membrana. ....	47
Figura 8 Funções de distribuição radial para os terminais catiônicos e contra-íons CL- utilizando os ligantes (a) 1-octanotiól, (b) 1-dodecanotiól e (c) 1-hexadecanotiól. ....	49
Figura 9 Artigo de capa da revista Cell. ....	53
Figura 10 Rede reguladora de genes reconstruída a partir de dados de expressão de genes provenientes de 16 tipos de células e tecidos humanos. ....	56
Figura 11 Construção e validação da plataforma CellNet. (A) CellNet foi projetado para analisar perfis de expressão de genes de células modificadas por reprogramação para a pluripotência, por conversão direta entre células somáticas ou por diferenciação dirigida de células-tronco com pluripotência induzida. Basicamente, CellNet é capaz de classificar amostras de entrada em tipos de células e tecidos pré-estabelecidos, quantificar a extensão na qual GRNs célula e tecido-específicas são estabelecidas nas amostras de entrada e atribuir escores para reguladores transcricionais de acordo com a probabilidade de que modificar sua expressão resultará em um melhor estabelecimento da GRN de interesse. (B) CellNet é baseado em GRNs célula- e tecido específicas reconstruídas a partir de dados de expressão de diversas células e tecidos e sujeitas à uma variedade de perturbações. (C) Utilizando um perfil de expressão de genes para quantificar o status ou estabelecimento de GRNs.(D) Combinando expressão de genes com GRNs para priorizar reguladores transcricionais e aperfeiçoar a qualidade das populações de células derivadas. ....	57
Figura 12 Análise de células primárias purificadas e células cultivadas. Classificação de células e tecidos (A) e status da GRN do coração (B) de cardiomiócitos primários purificadas por FACS. Classificação (C) e status da GRN de neurônios (D) em diversos tipos de neurônios purificados com base na expressão de Nav1.8. Classificação (E) e status da GRN de neurônios (F) de neurônios humanos. Classificação (G) e status da GRN do fígado (H) de hepatócitos primários. (I) Caracterização de neurônios corticais.(J) Estabelecimento da GRN de neurônios primários cultivados. Barras em azul escuro representam o status da referida GRN no conjunto de treinamento. Azul claro representa o status das GRNs indicadas nas amostras de entrada e barras de erro representam o desvio padrão. ....	60
Figura 13 Expressão de genes marcadores de hepatócitos maduros em hepatócitos cultivados (primeiras 15 colunas) e no conjunto de dados de treinamento (última coluna, rotulada "liver-train"). Genes controle "hou-	

sekeeping" são indicados com uma linha azul. . . . . 62

Figura 14 Análise de cardiomiócitos de camundongo. (A) Heatmap de classificação de células e tecidos de um experimento de curso temporal da diferenciação dirigida de ESCs para cardiomiócitos. Células progenitoras cardíacas (CPC), cardiomiócitos derivados de ESCs durante três semanas de diferenciação (ESC-CM). (B) Status das GRNs de ESCs (acima) e do coração (abaixo) em CPCs e ESC-CMs comparado ao status da GRN dos dados de treinamento para ESCs e tecido cardíaco. (C) Z-scores de genes do coração indicando acessibilidade aos promotores destes genes. (D) Heatmap de classificação da população inicial de células (fibroblastos) e iCMs duas e quatro semanas após expressão ectópica dos transgenes. (E) Status da GRN de fibroblastos (acima) e do coração (abaixo) em fibroblastos e iCMs comparado ao status da GRN de fibroblastos e coração provenientes dos dados de expressão de treinamento. (F) Z-scores para genes do coração em iCMs. (G) Heatmap de classificação de iCMs induzidos *in vivo* (iv-iCMs). (H) Status das GRNs de fibroblastos (acima) e do coração (abaixo) em fibroblastos e iv-iCMs. . . . . 64

Figura 15 Estabelecimento de GRNs aberrantes em CPC-ESCs e ESC-CMs. (A) O status da GRN associada a sub-rede 1, representando células-tronco e progenitoras hematopoiéticas e (B) GRN de fibroblastos durante a diferenciação dirigida de ESC de camundongo para cardiomiócitos. (C) Status da GRN de fibroblastos durante a diferenciação dirigida de ESC de camundongo para cardiomiócitos em outros dois estudos de diferenciação dirigida. (D) Escores de influência de rede (EIR) de reguladores transcricionais candidatos da GRN do coração. Escores menores que 0 indicam que o fator de transcrição precisar ser super-expresso nas células derivadas para estabelecer a GRN da célula alvo, cardiomiócitos neste caso. . . 68

Figura 16 Caracterização das populações celulares contidas nas amostras de células PBMCs. (A) Heatmap de classificação das amostras PBMCs. (B) Estabelecimento das GRNs de células T, macrófagos e células B. (C) Escores de influência de rede para PBMCs incubadas com AuNP por 24 e 48 horas mostrando que genes envolvidos em transdução de sinal em células do sistema imune são afetados pela interação com nanopartículas. 71

Figura 17 (A) Genes diferencialmente expressos (DEGs) ao comparar expressão de genes entre PBMCs controle e PBMCs incubadas com AuNP. (B) Heatmap mostrando DEGs para células PMBCs e 293T incubadas com nanopartículas (AuNP). (C) Sobreposição de DEGs para 24 e 48 horas de tratamento com AuNP. (D) Categorias funcionais (ontologia de genes) nas quais os DEGs se encontram. (E) Sub-rede ilustrando como os DEGs possivelmente interagem. . . . . 72

Figura 18 Condições de cultura celular influenciam programas de expressão de genes. (A) Heatmap de classificação de queratinócitos em condições de cultura organóide, "in vivo" e "in vitro". Queratinócitos são classificados como pele ("skin"). (B) Estabelecimento de GRNs associadas a cada uma das amostras de queratinócitos. Barras coloridas horizontais acima dos gráficos em barra indicam a posição destas amostras no heatmap de classificação.....	76
Figura 19 Análise de genes desregulados em queratinócitos com relação ao conjunto de treinamento da GRN da pele (CellNet). (A) Genes desregulados nas amostras controle de queratinócitos cultivados em culturas organóides (STAU1, TINCR). (B) Genes sub- e super-expressos. (C) Categorias funcionais as quais estes genes pertencem quando células são cultivadas em culturas organóides. (D) Genes desregulados em LCM, "sorted KC" e NHEK. (E) Genes diferencialmente expressos em culturas organóides, LCM, "sorted KC" e NHEK. (F) Genes desregulados em ambas as amostras de células "sorted KC" e NHEK. Categorias funcionais dos genes desregulados em "sorted KC" e NHEK.....	78
Figura 20 Esquema idealizado da nanopartícula sintetizada. Neste sistema, metaloproteinases clivam substratos peptídicos modificados com PEG 10 kDa, hipoteticamente expondo peptídeos de alta afinidade com a matrix extracelular.....	82
Figura 21 Fluxograma das estratégias de síntese de nanopartículas utilizadas.....	84
Figura 22 Heatmap de classificação para três tipos diferentes de câncer, melanoma, câncer no fígado e câncer colorretal.....	86
Figura 23 Caracterização de AuNP e AuNP-ECM. (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de AuNP antes da modificação de superfícies. (B) Medidas de distribuição de tamanho para nanopartículas antes da modificação de superfícies (AuNP) e após conjugação das moléculas peptídeo-PEG, tal como medido por DLS.....	89
Figura 24 Caracterização da seletividade das enzimas com relação aos seus substratos. (A) AuNP-ECM, funcionalizadas com substratos para MMP9 e incubadas com as enzimas MMP9 e uPA por uma hora. (B) AuNP-ECM, funcionalizadas com substratos para a enzima uPA e incubadas com as enzimas MMP9 e uPA.....	90
Figura 25 Catepsinas parecem ser conjugadas nas AuNP-ECM ao invés de clivar seus substratos. (A) Medidas de fluorescência monitorando a clivagem de peptídeos substratos para catepsina B por MMP9 e catepsina B. (B) Variação do tamanho da nanopartícula, sugerindo a adoração ou	

conjugação da enzima catepsina B na superfície das nanopartículas. . . . .	92
Figura 26 Esquema de uma abordagem terapêutica baseada na ativação da nanopartícula por metaloproteinases da matriz (MMP9 e MMP2) e inibição da atividade da catepsina B no microambiente tumoral como um tratamento para câncer. . . . .	93



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

iPSC	induced Pluripotent Stem Cell/Célula-tronco com pluripotência induzida . . . . .	25
ECM	Extracellular Matrix / Matriz extracelular . . . . .	29
ESC	Embryonic Stem Cells/Células-tronco embrionárias . . . . .	55
GRN	Gene Regulatory Networks / Redes Reguladoras de Genes . . . . .	55
EIR	Escode de Influência de Rede . . . . .	59
FACS	Fluorescence-activated cell sorting . . . . .	63
DEG	Differentially Expressed Genes / Genes diferencialmente expressos . . . . .	73



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	25
1.1	OBJETIVOS .....	26
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	26
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
<b>2.0.3</b>	<b>Interações nanopartícula-célula</b> .....	30
<b>2.0.4</b>	<b>Biomateriais como plataformas de cultura celular</b> .....	31
<b>2.0.5</b>	<b>Nanopartículas terapêuticas</b> .....	32
<b>2.0.6</b>	<b>Biologia computacional</b> .....	33
<b>3</b>	<b>QUÍMICA DE SUPERFÍCIE INFLUENCIA A TRANS- LOCAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DE BI- CAMADAS LIPÍDICAS</b> .....	35
3.1	METODOLOGIA .....	37
<b>3.1.1</b>	<b><i>Coarse-Graining</i> da Nanopartícula e da Membrana</b> .....	37
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
<b>3.2.1</b>	<b>Efeito da densidade de carga de superfície</b> .....	41
<b>3.2.2</b>	<b>Efeito do tamanho do ligante</b> .....	46
3.3	MODELANDO INTERAÇÕES NANOPARTÍCULA-CÉLULA	50
<b>4</b>	<b>DESCRIÇÃO DA PLATAFORMA CELLNET</b> .....	53
4.1	INTRODUÇÃO .....	54
4.2	CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA CELL- NET .....	56
4.3	AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE CULTURA CELULAR UTI- LIZANDO CELLNET .....	59
4.4	ENGENHARIA DE CARDIOMIÓCITOS .....	63
<b>5</b>	<b>INTERAÇÕES BIOMATERIAL-CÉLULA</b> .....	69
5.1	INTRODUÇÃO .....	69
5.2	NANOPARTÍCULAS DE OURO E RESPOSTAS IMUNO- LÓGICAS .....	70
5.3	CULTURAS ORGANÓIDES RECAPITULAM REDES RE- GULADORAS DE GENES ENDÓGENAS .....	74
<b>6</b>	<b>DESIGN DE NANOPARTÍCULAS BASEADO EM ANÁ- LISE TRANSCRIPTÔMICA</b> .....	81
6.1	METODOLOGIA COMPUTACIONAL E EXPERIMENTAL .	82
<b>6.1.1</b>	<b>Abordagem computacional</b> .....	82
<b>6.1.2</b>	<b>Síntese das nanoestruturas ativadas por proteases</b> .....	83
<b>6.1.3</b>	<b>Caracterização</b> .....	85

6.2	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES IMPORTANTES EM 3 DIFERENTES TIPOS DE CANCER .....	85
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
6.4	FRET PARA DETERMINAR A CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS .....	88
6.5	AUNP-ECM MODIFICADAS COM SUBSTRATOS PARA CATEPSINA B .....	91
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
8	<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	99
8.1	EM REVISTAS .....	99
8.2	EM CONGRESSOS .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A interface entre ciência dos materiais e biologia tem sido objeto de intensa investigação devido às promessas e possibilidades de desenvolver tratamentos mais eficientes para uma ampla variedade de doenças devastadoras. Formulações baseadas em nanopartículas podem ser utilizadas para distribuição de fármacos e formulações de vacinas, ou como biomateriais, promovendo regeneração tecidual. Como estes materiais interagem com células, interações material-célula têm sido investigadas utilizando uma série de métodos, tanto experimentais como técnicas computacionais. Frequentemente, estes estudos concentram-se em interações biofísicoquímicas que ocorrem na interface material-célula, amplamente referida como a interface Nano-Bio, inicialmente estudada neste trabalho utilizando simulações de dinâmica molecular. Embora interessante, isto imediatamente levou a novas questões, que não poderiam ser abordadas utilizando química computacional.

Em paralelo, estudos relacionados à síntese de nanopartículas, assim como o desenvolvimento de uma série de algoritmos de biologia computacional foram desenvolvidos, de modo a possibilitar o projeto racional de nanomateriais/biomateriais e analisar mudanças globais em programas de expressão de genes em células expostas a esses nanomateriais/biomateriais. A estratégia utilizada para investigar a biologia do câncer e interações material-célula nesta tese consistiu-se primeiramente no desenvolvimento de uma plataforma computacional, baseada em biologia de redes, para investigações em células-tronco, reprogramação de células somáticas para células-tronco pluripotentes (iPSCs), conversão entre células somáticas (por exemplo, fibroblastos para cardiomiócitos) e diferenciação (por exemplo, células-tronco para neurônios). A plataforma recebeu o nome de CellNet.

O software resultante, embora inicialmente aplicado para estudar células-tronco e engenharia celular, tem sido utilizado para estudar interações entre nanopartículas e células tais como macrófagos, células B e células T assim como o efeito de culturas de células biomiméticas no comportamento celular, quando dados de expressão de genes associados à condição de interesse estiverem disponíveis. Uma das principais motivações que levaram a abrangência de disciplinas relacionadas nesta tese foi que uma contribuição real deveria surgir da observação sob um novo ponto de vista da área de ciência dos materiais em medicina. Muitos trabalhos relatam o desenvolvimento de nanopartículas e biomateriais, e estudam em conjunto com células, mas poucos ou mesmo nenhum trabalho procura obter um "snapshot" global sobre o estado celular nas condições experimentais de interesse. Nesta tese, acredita-se que os primeiros passos em direção a

isto tenham sido realizados. A descrição acima remete as seguintes hipóteses:

1. Simulações de dinâmica molecular fornecem explicações plausíveis para possíveis vias fagocíticas ou citotoxicidade induzida por nanopartículas.
2. Interações nanopartícula-célula induzem mudanças em programas de expressão de genes mas não alteram identidade celular significativamente.
3. Condições microambientais influenciam a identidade celular.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Investigar interações nanopartícula-célula, biomaterial-célula assim como desenvolver nanopartículas para o tratamento de câncer e algoritmos de biologia computacional para áreas de câncer e células-tronco.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

1. Investigar interações físico-químicas entre nanopartículas e células utilizando simulações de dinâmica molecular.
2. Desenvolver uma plataforma computacional baseada em biologia de redes (CellNet) para avaliar o estabelecimento de redes reguladoras de genes em populações de células derivadas e priorizar reguladores transcricionais para otimizar os protocolos de engenharia celular.
3. Aplicar a plataforma CellNet para determinar quais genes associados a remodelagem da matriz extracelular são desregulados em câncer e com base nestes genes, projetar nanomateriais que se acumulam preferencialmente no microambiente tumoral.
4. Aplicar a plataforma CellNet para investigar a extensão na qual interações entre nanopartículas e células do sistema imunológico afetam o estabelecimento de redes reguladoras de genes e processos biológicos relevantes, como inflamação.

5. Aplicar a plataforma CellNet para elucidar como condições de cultura celular biomiméticas tendem a representar mais adequadamente programas de expressão de genes de queratinócitos, tal como quantificado pelo estabelecimento de redes reguladoras de genes e a ativação de vias de sinalização apropriadas para o desenvolvimento da pele humana.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O diagnóstico e tratamento de câncer baseado em nanotecnologia têm apresentado resultados promissores na área de medicina (PEER et al., 2007). Nanoestruturas multifuncionais (CHEN et al., 2010b) ou nanosistemas cooperativos (MALTZAHN et al., 2011), interagindo com células, vias de sinalização ou processos biológicos em geral, criam novas possibilidades para a pesquisa básica e o entendimento de questões complexas associadas à progressão tumoral e metástase (SCHROEDER et al., 2012). No entanto, para o sucesso deste paradigma emergente, uma compreensão ampla sobre o comportamento de nanomateriais *in vitro* e *in vivo* é necessária. Nanopartículas em meio biológico experimentam interações complexas (NEL et al., 2009), comprometem a integridade de membranas celulares (TONG et al., 2007), alteram a expressão de genes (BALASUBRAMANIAN et al., 2010) e são eliminadas do organismo por meio de diferentes mecanismos. Não obstante, estes nanomateriais ainda precisam ser capazes de distinguir células tumorais daquelas saudáveis ("tumor targeting") ou detectar células cancerosas em circulação, além de desempenhar sua função terapêutica tal como distribuir fármacos (SHI et al., 2010), terapia de genes (HARRIS et al., 2010) ou mesmo, em sistemas de terapias combinadas (CAO; LANGER, 2010).

A despeito dos muitos esforços aplicados nestas abordagens terapêuticas, a maioria das investigações atuais em nanoterapêuticos são realizadas principalmente em modelos de culturas de células bidimensionais (2D) ou modelos animais (PETROS; DESIMONE, 2010; CHO; ZHANG; XIA, 2011). No entanto, em um organismo vivo, o microambiente celular é inentemente tridimensional (3D) (BISSELL; RADISKY, 2001). Neste ambiente 3D, a Matriz Extracelular (ECM), é crucial para o desenvolvimento e comportamentos celulares tais como crescimento, proliferação, migração, mantendo seu metabolismo normal (HUTMACHER et al., 2010; HUTMACHER, 2010). O genótipo e fenótipo das células são altamente dependentes de interações complexas existentes, não somente com as células adjacentes, mas também com sua ECM. Portanto, culturas de células 2D não reproduzem apropriadamente interações célula-célula e célula-ECM, modificando a organização estrutural, expressão de genes, proliferação e migração celular (TIBBITT; ANSETH, 2009). Assim, recapitular o microambiente 3D é crucial para investigar a biologia do câncer, prospecção de fármacos, toxicologia (FISCHBACH et al., 2007) e engenharia de tecidos (TIBBITT; ANSETH, 2009).

Entretanto, uma lacuna existente tanto no desenvolvimento de nanopartículas quanto no desenvolvimento de biomateriais para engenharia de te-

cidos e modelos *in vitro* de doenças é a carência de abordagens sistemáticas para analisar globalmente o comportamento celular nestes diversos contextos experimentais. Neste sentido, as próximas seções deste capítulo procuram revisar sucintamente estudos na área de interações nanopartícula-célula e biomateriais como plataformas de cultura celular (assunto dos Capítulos 3 e 5), biologia computacional (assunto dos capítulos 4, 5 e 6) e nanopartículas terapêuticas (assunto do capítulo 6).

### 2.0.3 Interações nanopartícula-célula

Nanopartículas *in vivo* enfrentam diversas barreiras biológicas destacando-se especialmente a membrana celular. Uma compreensão mais ampla sobre as interações biofísicoquímicas (NEL et al., 2009) existentes entre nanomateriais e membranas celulares pode ter implicações importantes para o imageamento, fototerapia e distribuição de fármacos ou genes (VERMA et al., 2008; VERMA; STELLACCI, 2010). Diversos estudos mostram que a química de superfície significativamente afeta as interações nanopartícula-célula. Chitharani e colegas (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006) investigaram o efeito do tamanho e forma de nanopartículas de ouro na absorção por células. A cinética e concentração de saturação foram dependentes do tamanho e o estudo delineou implicações para o design de nanomateriais para aplicações biomédicas. Comparado a nanopartículas esféricas, a internalização de nanopartículas cilíndricas é menor. Em uma outra investigação o mecanismo de absorção celular e eliminação de nanopartículas de ouro recobertas com transferrina foi estudado considerando diferentes tamanhos e formas. A via de endocitose mediada por clatrina mostrou-se ser o mecanismo predominante de internalização destes nanomateriais.

Por outro lado, nanopartículas de ouro e prata recobertas com anticorpos podem regular a internalização mediada por receptores de membrana (JIANG et al., 2008). O estudo demonstrou que a ativação de receptores de membrana foi dependente do tamanho das nanopartículas. Todas as nanopartículas com um tamanho entre 2 e 100 nm alteraram processos de sinalização essenciais para a manutenção de funções celulares, com nanopartículas de 40 e 50 nm apresentando os efeitos mais evidentes. Estes resultados indicaram que nanopartículas não podem ser vistas como simples veículos de transporte de terapêuticos e sim como componentes intrinsecamente ativos em processos biológicos (JIANG et al., 2008; YI et al., 2010).

Buscando obter um critério de design para interações nanomaterial-célula, diversas simulações baseadas em dinâmica molecular têm sido realizadas (LIN et al., 2010, 2011; LI; CHEN; GU, 2008; LEE; LARSON, 2006;

LIN et al., 2010; YAN; YU, 2009; DING; TIAN; MA, 2012). Vacha et al. (VÁCHA; MARTINEZ-VERACOECHEA; FRENKEL, 2011) reportaram simulações de dinâmica molecular *coarse-grained* (CGMD) sobre a endocitose de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas, recobrimentos e afinidade de ligação a membrana. Nestas simulações, partículas esféricas maiores experimentam endocitose mais facilmente do que aquelas menores e esferocilindróides foram mais efetivos em sua habilidade de translocação através da membrana, quando comparados com partículas esféricas de diâmetros equivalentes. Simulações também foram realizadas por Yang e Ma para compreender como nanopartículas de diferentes formas interagem com membranas celulares. Os resultados indicam que anisotropia de forma e orientação inicial da nanopartícula significativamente afetam interações nanopartícula-membrana e o volume da nanopartícula apresenta um efeito indireto (YANG; MA, 2010). Com relação à química de superfície, o Capítulo 3 apresenta detalhes do estudo (ROCHA; CARAMORI; RAMBO, 2013).

#### **2.0.4 Biomateriais como plataformas de cultura celular**

Um modelo 3D de câncer oral humano foi desenvolvido utilizando scaffolds de PLG altamente porosos (FISCHBACH et al., 2007) em que o potencial maligno das células tumorais foi avaliado como uma função do contexto tecidual 3D e hipóxia central. Nesta plataforma de cultura de células 3D, os relacionamentos entre fatores angiogênicos VEGF, bFGF e IL-8 foram similares ao de tumores xenoinxertos *in vivo* mas distintos daqueles obtidos em culturas de células 2D. Para avaliar a importância destas descobertas *in vitro* para a formação e malignidade tumoral, células tumorais previamente cultivadas em culturas 2D e em scaffolds de PLG foram implantadas em ratos SCID. Tumores maiores cresceram utilizando-se células cultivadas em scaffolds de PLG 3D, em comparação aqueles cultivados em sistemas 2D convencionais. Importaneamente, a capacidade invasiva foi intensificada nos sistemas 3D e as células tumorais foram menos sensíveis a fármacos citotóxicas (FISCHBACH et al., 2007).

Hidrogéis de alginato também têm sido aplicados para estudar câncer em três dimensões (FISCHBACH et al., 2009). Neste estudo, peptídeos RGD foram incorporados nos hidrogéis e recriaram algumas características do microambiente tumoral tal como arquitetura 3D e propriedades de adesão celular. Maior secreção de IL-8 mostrou-se dependente da ligação de integritinas com o peptídeo de adesão RGD. Os autores observaram que a secreção de VEGF não foi afetada em cultura 3D e *in vivo*, na presença ou ausência de ligação a integritinas, mas aumentou em culturas 2D. Além disso, estas ECMs de

alginate permitem investigações relacionadas a vascularização tumoral como uma função da rigidez (stiffness) da matriz e densidade de peptídeos RGD enquanto mantém constante as propriedades físico-químicas.

Culturas 3D biomiméticas reproduzem mais adequadamente as características de tumores pré-vascularizados, tais como capacidade proliferativa não inibida e regiões de hipóxia envolvendo um centro necrótico (SZOT et al., 2011). Comparada com o crescimento tumoral em culturas 2D, a taxa de proliferação em 3D é mais lenta e fisiologicamente relevante (HUTMACHER et al., 2010). Hidrogéis de colágeno tipo I foram utilizados para desenvolver um modelo de câncer de mama 3D, cultivando-se células MDA-MDB-231 nestes hidrogéis. Interações célula-célula e célula-matriz presentes durante a progressão tumoral *in vivo* foram recriadas e a proliferação celular foi observada. Células tumorais apresentaram potencial angiogênico com regulação positiva de VEGF e uma análise da expressão de genes demonstrou um aumento significativo de HIF-1 $\alpha$  e VEGF-A por células cultivadas no hidrogel de colágeno, comparada com culturas em monocamada.

### 2.0.5 Nanopartículas terapêuticas

Nanomateriais estão sendo crescentemente investigados para aplicações biomédicas, especialmente no diagnóstico e tratamento de câncer (SHUBAYEV; II; JIN, 2009; DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; FERRARI, 2005) e engenharia tecidual (ZHANG; WEBSTER, 2009). Diversas partículas em nanoescala estão sendo desenvolvidas para aplicações médicas com diferentes composições tais como metálicas (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; KENNEDY et al., 2011), poliméricas (ZHOU et al., 2012) ou cerâmicas (ZHANG et al., 2011; HANLEY et al., 2008). As partículas também podem apresentar diferentes morfologias como nanoesferas (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008), nanotubos (POLAND et al., 2008), nanofios (HONG et al., 2011), nanocubos (SUN; XIA, 2002) e nanocages (YAVUZ et al., 2009). Suas superfícies podem ser funcionalizadas com biomoléculas como anticorpos (QIAN et al., 2008), peptídeos (PARK et al., 2009), oligonucleotídeos (JEWELL et al., 2011) ou polímeros como PEG ou pNIPAAm.

Nanopartículas são frequentemente projetadas como carregadores de fármacos de baixo peso molecular ou biomoléculas (proteínas e siRNA) (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009) ou são utilizadas como transdutores fototérmicos (CHEN et al., 2010). As vantagens de utilizar nanopartículas como uma abordagem terapêutica incluem longos tempos de circulação (MALTZAHN et al., 2009), habilidade para encapsular fármacos ou conjugá-las em suas superfícies (PARK et al., 2009), ativar a liberação das

fármacos remotamente (TIMKO; DVIR; KOHANE, 2010; DERFUS et al., 2007) ou a possibilidade de ativá-las por sinais endógenos como pH ou degradação enzimática (HARRIS et al., 2010). Direcionar nanopartículas para os tumores explorando o efeito EPR ou domínios de alta afinidade para receptores localizados na vasculatura tumoral, ECM ou na superfície celular podem potencialmente reduzir efeitos colaterais sistêmicos (SCHROEDER et al., 2012). Além disso, hipertermia é uma outra modalidade de tratamento que pode ser utilizada cooperativamente com quimioterapia onde nanomateriais têm sido investigados como transdutores térmicos (CHEN et al., 2010; LOO et al., 2005; LAL; CLARE; HALAS, 2008) que convertem um estímulo externo, como radiação no infra-vermelho próximo ou um campo magnético, em calor, localmente elevando a temperatura do microambiente tumoral e induzindo morte celular (ROCHA; PORTO; RAMBO, 2014).

## 2.0.6 Biologia computacional

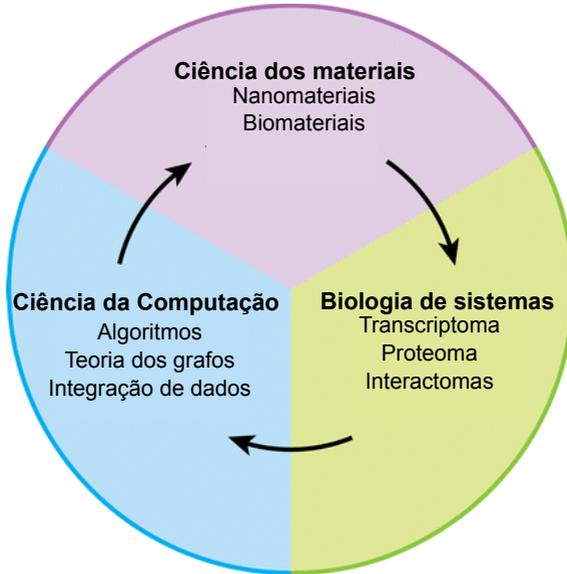
Biologia de sistemas é uma campo de pesquisa que busca um entendimento compreensivo e unificado da célula integrando métodos experimentais e computacionais para responder algumas questões básicas como: quais são as propriedades e estruturas básicas das redes biológicas subjacentes ao comportamento celular? Progressos em projetos relacionados a sequenciamento de genomas, e a grande quantidade de dados provenientes de *microarrays* de DNA, proteomas, metabolomas e outros têm levado a necessidade de estratégias computacionais inovadoras para extrair informações biologicamente relevantes destes conjuntos de dados.

Existem diversas ferramentas e algoritmos de biologia computacional atualmente disponíveis tais como HotNet (VANDIN et al., 2011), um algoritmo para encontrar sub-redes significativamente alteradas em grandes redes de interação de genes, ResponseNet (YEGER-LOTEM et al., 2009), que procura identificar proteínas em redes de interação proteína-proteína e proteína-DNA que não foram detectadas em screenings genéticos e análise de transcriptoma, PrincePlugin (GOTTLIEB et al., 2011), que prioriza genes associados a doenças em rede de interação, TopHat (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) para análise de dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq), e CellNet. CellNet, é uma plataforma de biologia de redes projetada inicialmente para análises de células-tronco e reprogramação celular cujos detalhes serão apresentados no Capítulo 4 desta tese, uma vez que constitui uma parte importante desta pesquisa.

Neste sentido, conforme se tornará explícito ao longo desta tese, diversas abordagens, tanto experimentais, quanto computacionais foram utilizadas

durante esta pesquisa. A Figura 1 ilustra as áreas gerais envolvidas no presente trabalho, integrando biologia de sistemas e ciência da computação para abordar questões em biomateriais, nanomateriais, câncer e células-tronco.

Figura 1: As principais contribuições desta tese abrangem as áreas de ciência dos materiais, ciência da computação e biologia computacional.



### 3 QUÍMICA DE SUPERFÍCIE INFLUENCIA A TRANSLOCAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DE BICAMADAS LIPÍDICAS

Figura 2: Artigo de capa da revista PCCP (ROCHA; CARAMORI; RAMBO, 2013).



Nanomateriais são plataformas promissoras para aplicações terapêuticas (PEER et al., 2007). Suas propriedades multifuncionais tais como encapsulamento de fármacos, *targeting* tumoral e terapia fototérmica podem ser exploradas para a entrega de fármacos e genes no tratamento de câncer (MALT-ZAHN et al., 2011) e medicina regenerativa (DVIR et al., 2011b, 2011a). No entanto, uma melhor compreensão das interações entre nanomateriais e sistemas biológicos (em particular, membranas celulares) é necessária para efetivamente utilizar nanotecnologia em aplicações biomédicas (VERMA et al., 2008). Diversas investigações teóricas e experimentais indicam que as propriedades físico-químicas de nanopartículas definem perfis de biodistribuição (HARRIS et al., 2010), internalização celular e toxicidade induzida por estes materiais em nanoescala (VERMA et al., 2008; VERMA; STELLACCI, 2010).

Nanopartículas têm que superar inúmeras barreiras biológicas para acumularem-se nos tumores e efetuarem suas funções terapêuticas (PETROS; DESIMONE, 2010; DAVIS; CHEN; SHIN, 2008). Interações em nanoescala são particularmente interessantes desde que aspectos físico-químicos de nanopartículas afetam suas interações com células *in vitro* e *in vivo*. Estas interações podem ser investigadas utilizando simulações de dinâmica molecular *coarse-grained* (CGMD), como indicado em diversos estudos recentes (LI; GU, 2010; YAN; YU, 2009). Por exemplo, utilizando abordagens experimentais e simulações computacionais foi demonstrado que o principal mecanismo de internalização de nanomateriais unidimensionais é mediado pelas extremidades de materiais como nanotubos ou nanofios, visto que o tempo necessário para o envolvimento da nanoestrutura completa seria maior do que envolver a "ponta" da nanoestrutura e então internalizá-la por meio de processos dependentes de energia (SHI et al., 2011). Investigações recentes utilizando o campo de força MARTINI para criar modelos de bicamadas lipídicas e estudar o efeito de variar as propriedades das nanopartículas em aspectos estruturais das membranas como por exemplo, a formação de nanoporos de superfície, que facilitam a internalização destes nanomateriais, têm sido reportadas (RAMALHO; GKEKA; SARKISOV, 2011; LIN et al., 2010, 2011). Como exemplos de nanomateriais investigados utilizando esta abordagem pode-se citar dendrímeros, fulerenos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro (LEE et al., 2009; AINALEM et al., 2010; BEDROV et al., 2008; WALLACE; SANSOM, 2008; LIN et al., 2010; CHAN; KRAL, 2011; LAI et al., 2012; WANG; LU; LAAKSONEN, 2012).

Métodos de modelagem molecular têm se mostrado uma ferramenta importante não somente para o projeto de nanopartículas mas também para descrever interações dinâmicas que ocorrem na interface entre nanomateriais e sistemas biológicos (YANG; MA, 2010; LEE; LARSON, 2006; LEE et al.,

2009; WONG-EKKABUT et al., 2008; NEL et al., 2009) fornecendo resultados qualitativos consistentes com resultados experimentais (SHI et al., 2011; CHO et al., 2009; VERMA et al., 2008; VERMA; STELLACCI, 2010). É altamente desejável criar ferramentas preditivas para estudar os efeitos das interações de nanopartículas com células, antes da realização de experimentos. Embora a maioria das investigações atuais tenham concentrado-se no efeito do tamanho e morfologia destes materiais na internalização celular, somente alguns estudos têm investigado o efeito da química de superfície nas interações entre nanopartículas e bicamadas lipídicas.

Endocitose mediada por receptor pode ser favorecida utilizando ligantes apropriados na superfície das nanopartículas. Além disso, processos de internalização passiva podem ser promovidos utilizando um projeto adequado de química de superfícies. Uma vez que as membranas celulares de células tumorais possuem uma carga líquida negativa, nanopartículas catiônicas são capazes de penetrar membranas celulares mais eficientemente do que nanopartículas aniônicas. Além disso, funcionalização com peptídeos de penetração celular (CPP) e ligantes sintéticos inspirados em CPP efetivamente penetram membranas celulares (VERMA; STELLACCI, 2010). Neste capítulo, foi sistematicamente investigado o efeito da densidade de carga de superfície e o comprimento de ligantes de superfície na internalização celular de nanopartículas de ouro.

## 3.1 METODOLOGIA

### 3.1.1 *Coarse-Graining* da Nanopartícula e da Membrana

Simulações de dinâmica molecular atomísticas foram executadas para construir uma monocamada auto-organizada de ligantes alquil-tiól na superfície de uma nanopartícula de ouro com diâmetro de 2.2 nm. Para este fim, foi utilizado o software Packmol para recobrir a superfície de uma nanopartícula com 100 moléculas alquil-tiól (MARTÍNEZ et al., 2009) e o software LAMMPS<sup>®</sup> foi utilizado para minimizar energia e equilibrar esta estrutura em resolução atômica (PLIMPTON, 1995).

As nanopartículas de ouro foram equilibradas em temperatura ambiente utilizando um potencial de muitos-corpos chamado *embedded-atom method* (EAM) (DAW; BASKES, 1984) e diversos campos de força combinados foram utilizados para formar uma monocamada auto-organizada na superfície da nanopartícula. Um potencial "united-atom" foi utilizado para descrever as interações intra- e inter-moleculares dos segmentos alquil, um poten-

cial de Morse para descrever interações ouro-tiól e um potencial de Lennard-Jones para interações tiól-tiól e tiól-alquil, buscando representar apropriadamente as interações entre os componentes de superfície da nanopartícula. Um procedimento de aquecimento cíclico foi executado para formar a camada auto-organizada na superfície da nanopartícula de ouro. Após simulações atômicas, um nanocluster de ouro passivado com uma monocamada auto-organizada foi obtido. Cargas foram adicionadas aos sítios terminais dos ligantes e aleatoriamente distribuídas na superfície da nanopartícula.

O campo de força para simulações biomoleculares MARTINI foi utilizado para "coarse-graining" dos modelos atômicos (MARRINK; VRIES; MARK, 2003; MARRINK et al., 2007). Este campo de força foi extensivamente validado para simular auto-organização de sistemas lipídicos incluindo vesículas (MARRINK; MARK, 2003b, 2003a), liposomos (LOUHIVUORI et al., 2010) e bicamadas lipídicas (MARRINK; VRIES; MARK, 2003; MARRINK et al., 2007). Neste campo de força, a cada quatro átomos "pesados" em molécula (átomos que não são hidrogênio) um mapeamento para uma "bolha" efetiva é realizado (4 átomos passam a ser representados por um "átomo"), reduzindo o tempo computacional. Diferentes tipos de interação são representados por quatro tipos diferentes de "bolhas": polar (P), apolar (C), não-polar (N) e carregada (Q). Diversos subtipos são definidos dentro de cada tipo principal para descrever mais apropriadamente a natureza dos átomos representados como, por exemplo, a capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ou diferentes níveis de polaridade (MARRINK et al., 2007).

Considerando estes tipos de "bolhas" e a natureza química subjacente das nanopartículas aqui em consideração, o "coarse-graining" destas estruturas foi realizado por meio de mapeamentos 1:1 para átomos de enxofre e ouro, que foram rigidamente fixados no modelo "coarse-grained". Para as cadeias alquil, um mapeamento 4:1 foi realizado e sítios de interação C1 do campo de força MARTINI foram atribuídos. Estas "bolhas" coarse-grained foram conectadas por ligações harmônicas e restringidas por ângulos harmônicos, como definido no campo de força MARTINI.

Dois modelos de biomembranas foram desenvolvidos. O primeiro é caracterizado por uma carga total neutra e é composto por lipídeos *dipalmitoylphosphatidylcholine* (DPPC). O software Packmol foi utilizado para construir as bicamadas lipídicas a partir de um único lipídeo DPPC *coarse-grained*. A segunda bicamada lipídica é uma mistura de lipídeos DPPC e *dipalmitoylphosphatidylglycerol* (DPPG). Ambos os modelos *coarse-grained* de lipídeos possuem 12 "bolhas" mas DPPG possui um grupo glicerol ao invés de grupo cloro (*choline*), que confere uma carga total negativa ao lipídeo.

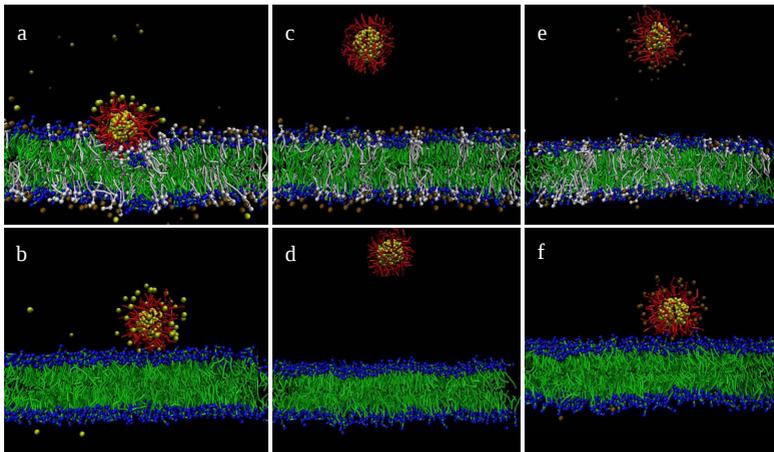
A bicamada negativa foi construída a partir da bicamada neutra substituindo aleatoriamente lipídeos DPPC por DPPG em uma razão de 3:1. Os parâmetros para estes lipídeos são aqueles descritos no campo de força MARTINI. O efeito do comprimento do ligante também foi explorado utilizando simulações de dinâmica molecular "coarse-grained". Três ligantes foram considerados: 1-octanotiól, 1-dodecanotiól e 1-hexadecanotiól.

Cada bicamada lipídica foi inserida em uma caixa de simulação cúbica com dimensões de  $20 \times 20 \times 20$  nm e imersa em água. As bicamadas lipídicas são compostas por 1200 lipídeos e "bolhas" de água foram adicionadas para preencher a caixa de simulação. Primeiramente, o sistema água-bicamada foi equilibrado utilizando o "isothermal-isobaric ensemble (NPT ensemble)". Após equilíbrio, a nanopartícula funcionalizada com ligantes foi posicionada 5 nm acima do centro da bicamada, cuidadosamente assegurando que não existe contato entre a nanopartícula e a membrana e que a nanopartícula inteira encontra-se dentro da caixa de simulação. Então, íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram adicionados para neutralizar o sistema e condições de contorno periódicas foram aplicadas. As simulações foram executadas utilizando passos de integração de 20 fs. Temperatura foi configurada para 305 K utilizando o termostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984). O cutoff para interações Coulombianas de curto-alcance e interações de van der Waals foi de 1.2 nm. O método "mesh Ewald summation (PME)" (ESSMANN et al., 1995) foi utilizado para descrever interações Coulombianas de longo-alcance. Simulações "coarse-grained" foram realizadas utilizando o software GROMACS, versão 4.5.3 (SPOEL et al., 2005). Todas as simulações foram executadas pelo menos duas vezes para assegurar reprodutibilidade dos resultados.

### 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 mostra *snapshots* de simulações para seis diferentes configurações dos sistemas nanopartícula-membrana após simulações de 50 ns. Estes sistemas são constituídos por duas bicamadas lipídicas (DPPC e DPPC/DPPG) e três diferentes tipos de nanopartículas (catiônica, aniônica e neutra). Considerando estes snapshots de simulação, interações favoráveis evidentes entre nanopartículas e a membrana são observadas nos casos (a), (b) e (f), em que a nanopartícula adsorveu na superfície da membrana após 50 ns de simulação. Sistemas (b) e (f) são consistentes com simulações dendrímero-membrana (LEE; LARSON, 2006). No entanto, devido a interações eletrostáticas entre a nanopartícula catiônica e a biomembrana aniônica, o snapshot no caso (a) exhibe uma tendência para envolver a nanopartícula.

Figura 3: *Snapshots* das interações de nanopartículas de ouro com diferentes químicas de superfície e dois tipos de bicamadas lipídicas. Bicamadas lipídicas nas figuras (a), (c) e (e) são aniônicas (lipídeos DPPC/DPPG) e estão interagindo com nanopartículas catiônicas, hidrofóbicas e aniônicas, respectivamente. Nas figuras (b), (d) e (f), estas nanopartículas estão interagindo com a bicamada lipídica neutra (DPPC). Cores: headgroups dos lipídeos DPPC são mostrados em azul com as "caudas"  $\text{vspace 1mm}$  mostradas em verde. Para os lipídeos DPPG, tanto dos headgroups quanto as "caudas" estão em branco. Átomos de ouro na nanopartícula são mostrados em amarelo e ligantes em vermelho. Íons  $\text{NA}^+$  and  $\text{CL}^-$  estão em *ochre* e amarelo, respectivamente.



Nos casos (c), (d) e (e), interações nanopartícula-membrana não são espontaneamente favorecidas, possivelmente devido às interações eletrostáticas existentes entre ambos os componentes aniônicos. No entanto, *in vitro* ou *in vivo*, nanopartículas aniônicas são capazes de penetrar membranas celulares, porém menos eficientemente quando comparadas a nanopartículas catiônicas. Como esperado, nanopartículas catiônicas interagem preferencialmente com biomembranas aniônicas, e como a membrana celular de células tumorais tende a ser levemente negativa (LIN et al., 2010), esta característica de superfície aumenta a eficiência de internalização. No entanto, não foi observado translocação completa da nanopartícula através da bicamada lipídica durante os tempos de simulação utilizados neste trabalho. Tais fenômenos têm sido observados somente com níveis ainda maiores de "coarse-

graining" dos modelos atomísticos subjacentes (YANG; MA, 2010; VÁCHA; MARTINEZ-VERACOECHEA; FRENKEL, 2011).

A despeito da complexidade de membranas celulares biológicas com relação à heterogeneidade de lipídeos, alta densidade de proteínas de membrana e processos altamente dinâmicos ocorrendo no microambiente celular, as tendências apresentadas são consistentes com resultados experimentais e computacionais anteriores (CHO et al., 2009; HARUSH-FRENKEL et al., 2007; HONG et al., 2004; LIN et al., 2010, 2011). Além disso, sugere-se que esta interface em nanoescala pode ser qualitativamente investigada utilizando técnicas de modelagem molecular, especialmente utilizando simulações multi-escala. Com base na discussão acima, foi observado que nanopartículas catiônicas favoravelmente adsorvem em membranas celulares. Portanto, resolveu-se investigar o efeito da densidade de carga na superfície da nanopartícula em suas interações com biomembranas aniônicas.

### 3.2.1 Efeito da densidade de carga de superfície

O efeito da densidade de carga de superfície nas interações nanopartícula-membrana foi investigado construindo seis sistemas consistindo de uma nanopartícula com recobrimentos catiônicos de 0, 20, 40, 60, 80 e 100% interagindo com uma bicamada lipídica de carga líquida negativa. Os resultados sugerem diferentes mecanismos de interação. A Figura 4 mostra snapshots das simulações após 100 ns. Interessantemente, densidades de carga de 20% favoreceram a translocação da nanopartícula pela parte superior da membrana. A nanopartícula então permaneceu estável dentro da região hidrofóbica da bicamada lipídica durante o restante da simulação. Em acordo com simulações anteriores utilizando dendrímeros interagindo com biomembranas, um nanoporo foi formado, sugerindo a ruptura das partes superior e inferior da membrana (LEE; LARSON, 2006; YAN; YU, 2009). As simulações aqui apresentadas também estão de acordo com simulações realizadas por Ainalem e colegas (AINALEM et al., 2010), em que dendrímeros foram capazes de penetrar na região hidrofóbica da membrana, adotando uma configuração transmembrana, com átomos carregados interagindo com os grupos terminais dos lipídeos e o núcleo do dendrímero permanecendo estável na região hidrofóbica.

Analisando as trajetórias de simulação para nanopartículas com 20, 40, 60 e 80% de carga, foi observada uma relação entre densidade de carga e interações com contra-íons que, provavelmente explica os resultados de simulação. Para 20% de carga, no início das simulações, somente alguns poucos contra-íons interagiram com os grupos terminais catiônicos da nanopartícula.

À medida que a simulação procede, terminais catiônicos da nanopartícula começam a interagir com grupos fosfato no lado oposto da membrana. Quando isto acontece, a nanopartícula penetra na bicamada lipídica e permanece no interior hidrofóbico da membrana. Portanto, interações entre terminais catiônicos da nanopartícula e grupos terminais carregados dos lipídeos juntamente com a natureza hidrofóbica do núcleo da nanopartícula criam uma configuração estável no interior hidrofóbico da membrana que dificulta a translocação completa através da bicamada. Para 40, 60 e 80% de carga, mais contra-íons interagindo com a nanopartícula foram observados durante toda a simulação, que evitaram interações mais fortes com grupos fosfato em ambos os lados da membrana, criando uma barreira para a translocação. No entanto, é importante notar que tais densidades de carga não foram suficientes para induzir reorganizações estruturais significativas da membrana, que são evidentes para nanopartículas contendo 100% de seus ligantes positivamente carregados.

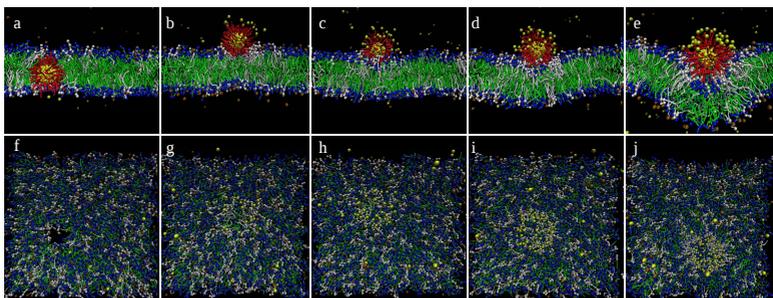
Além disso, foi previamente demonstrado que nanopartículas Janus apresentam dois modos distintos de interação associados a sua natureza hidrofóbica/hidrofílica, em que nanopartículas são capazes de penetrar ou serem envolvidas pela bicamada lipídica (DING; MA, 2012a). Quando baixas densidades de carga são utilizadas, a propriedade hidrofóbica das nanopartículas é mais proeminente do que a densidade de carga. Neste caso, a carga é suficiente para mediar a atração da nanopartícula para a membrana e interações hidrofóbicas e eletrostáticas tendem a induzir a nanopartícula ou a penetrar a membrana ou adsorver sobre ela. Entretanto, à medida em que a densidade de carga aumenta, a nanopartícula exibe uma natureza mais hidrofílica e interações com grupos fosfato negativos da bicamada fazem com a nanopartícula repouse sobre a bicamada e um processo de envolvimento da nanopartícula se inicia, semelhante ao observado para nanopartículas Janus (DING; MA, 2012a).

A despeito das propriedades de transporte seletivas de (macro)moléculas apresentadas por membranas celulares, em que moléculas pequenas tais como  $O_2$  e  $CO_2$  são capazes de difundir passivamente para o interior das células, membranas celulares utilizam diversos mecanismos para transportar íons importantes e proteínas em nanoescala por meio de proteínas de transporte especializadas. Nanomateriais podem ser projetados para atravessar passivamente estas barreiras celulares (VERMA et al., 2008) com a formação de poros transientes sendo um mecanismo plausível explicando, ao menos parcialmente, estes fenômenos. Evidências de estudos utilizando CPPs (HERCE; GARCIA, 2007) assim como estudos utilizando dendrímeros fornecem suporte a esse mecanismo (LEE; LARSON, 2006; LEE et al., 2009; AINALEM et al., 2010).

Aumentando a densidade de carga para 40%, a nanopartícula induziu

pouca desordem em sua vizinhança local, enquanto que nanopartículas com densidades de carga de 60 e 80% exibiram um comportamento levemente diferente, passando a ser envolvidas pela membrana. Este processo é evidente para 100% de carga, onde mudanças globais na dinâmica da membrana ocorrem, com a membrana reduzindo sua área superficial para acomodar a nanopartícula. Por meio deste processo, a integridade estrutural da membrana é preservada e a nanopartícula não é capaz de translocar para a região hidrofóbica.

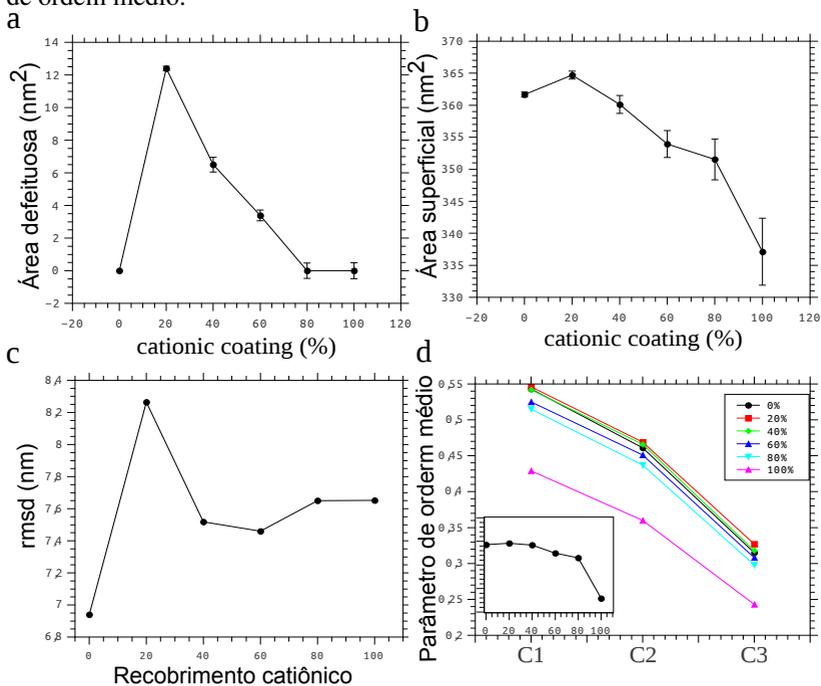
Figura 4: Interações de nanopartículas de ouro com diferentes recobrimentos de superfície catiônicos e bicamadas lipídicas negativas. (a), (b), (c), (d) e (e) mostram visualizações da seção cruzada dos sistemas nanopartícula-membrana com densidades de carga de 20, 40, 60, 80 e 100%. (f), (g), (h), (i) e (j) mostram visões do topo destes sistemas.



Propriedades estruturais destes sistemas foram calculadas e são apresentadas na Figura 5. Nanopartículas com 20, 40 e 60% de carga induziram maior desordem na bicamada conforme indicado na Figura 5(a). Interessantemente, as simulações revelaram que a nanopartícula com 20% de carga penetrou mais efetivamente a bicamada lipídica e induziu maior nível de desordem. Simulações com 15 e 25% de carga apresentaram resultados similares, gerando um nanoporo na superfície da membrana (Figura 4(a) e (f)). Além disso, simulações utilizando uma membrana de  $40 \times 40$  nm também foram executadas e os resultados foram similares. No entanto, embora as simulações contendo nanopartículas com 40 e 60% de carga induzam reorganização de lipídeos quando a nanopartícula adsorve sobre a membrana, a extensão da desordem induzida ocorre somente na parte superior das membranas.

À medida que a densidade de carga aumenta, as áreas defeituosas são reduzidas uma vez que a nanopartícula adsorve na superfície da membrana. No entanto, ao invés de translocação, o comportamento observado foi o en-

Figura 5: Propriedades estruturais das membranas como uma função da densidade de carga. (a) Áreas defeituosas induzidas pela nanopartícula com diferentes densidades de carga de superfície, (b) "Encolhimento" da membrana durante os processos adsorção e rompimento/empacotamento, (c) o erro médio quadrático entre a membrana equilibrada e a membrana interagindo com a nanopartícula. (d) Reorganização de lipídeos como medido por parâmetros de ordem médio.



volvimento da nanopartícula pela membrana, como evidenciado pelo "encolhimento" da membrana, Figura 5(b) e a redução de defeitos na superfície da mesma, evitando translocação passiva. Quando 100% de carga foi utilizado, a membrana exibiu uma redução de aproximadamente 14% de sua área original. Esta tendência para envolver a nanopartícula tem sido observada em outras simulações utilizando dinâmica dissipativa de partículas (DPD) (VÁ-CHA; MARTINEZ-VERACOECHEA; FRENKEL, 2011). Foi então calculado o erro quadrático médio (RMSD) (Figura 5(c)) onde é possível constatar que a nanopartícula funcionalizada com 20% de carga induz os desvios estruturais mais significativos.

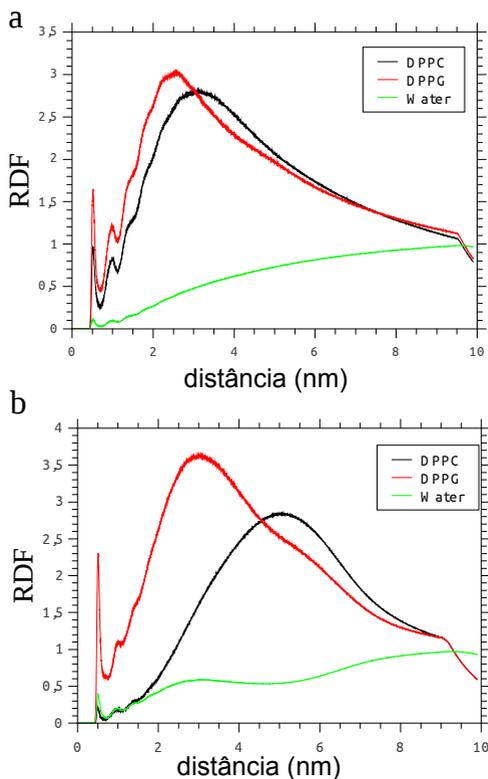
Parâmetros de ordem foram também determinados para analisar o efeito da densidade de carga nas propriedades estruturais da membrana, como mostra a Figura 5(d). Parâmetros de ordem variam entre 1 (orientação perfeita com relação a normal da bicamada) e -0,5 (anti-alinhamento) ou 0 para orientação aleatória. Comparando os parâmetros de ordem para as densidades de carga 0 e 20%, nós observamos um pequeno aumento nos parâmetros de ordem. Provavelmente, isto acontece devido a reorganização de lipídeos induzida pela formação de nanoporos na superfície das membranas. Os nanoporos formados ocupam uma área de  $12,40 \text{ nm}^2$  na superfície da membrana e embora desordem local seja induzida os demais lipídeos na bicamada poderiam estar formando uma fase mais ordenada.

Neste contexto, os parâmetros de ordem estão relacionados com o envolvimento da nanopartícula, uma vez que são calculados com base na normal da bicamada. À medida que a carga de superfície aumenta, a área de superfície da membrana é reduzida, como observado na Figura 4(e),(j) e na Figura 5(b). Portanto, a redução dos parâmetros de ordem é consistente com o "encolhimento" da membrana e a tendência para envolver a nanopartícula, como evidenciado para densidades de carga iguais a 100%. Portanto, os parâmetros de ordem nesta análise referem-se a curvaturas de membrana e não à desordem induzida. O inset na Figura 5(d) mostra os parâmetros de ordem para as ligações C1-C2 na molécula lipídica, dando ênfase à tendência de envolver a partícula.

Funções de distribuição radial (RDF) de lipídeos DPPC, DPPG e água em torno da nanopartícula são apresentadas na Figura 6(a) e (b). Para 20% de carga, Figura 6(a), o comportamento de lipídeos DPPC e DPPG em torno da nanopartícula é similar. No entanto, lipídeos DPPG estão mais próximos da superfície da nanopartícula, devido a interações eletrostáticas favoráveis. O pico em  $0,25 \text{ nm}$  é observado mais claramente para lipídeos DPPG, enfatizando a importância da complementariedade de carga para estas interações. No entanto, devido a formação de um nanoporo na superfície da membrana, ambos os lipídeos estão em torno da nanopartícula.

Figura 6(b) mostra a RDF para a nanopartícula com 100% de carga. A intensidade do pico para lipídeos DPPG próximo a  $0,25 \text{ nm}$  é consideravelmente maior do que para lipídeos DPPC e muito mais lipídeos DPPG estão em torno da nanopartícula. Em ambos os casos, 20 e 100% de carga, estas curvas RDF mostram que os ligantes catiônicos das nanopartículas interagem mais fortemente com lipídeos que possuem uma carga total negativa, embora estas interações também ocorram para os grupos negativos dos lipídeos DPPC. Estes resultados sugerem que interações eletrostáticas são importantes para a translocação ou envolvimento de nanopartículas por bicamadas lipídicas e podem induzir a formação de poros ou levar a processos semelhantes

Figura 6: Funções de distribuição radial entre lipídeos DPPC, DPPG, água e a nanopartícula de ouro. (a) apresenta RDFs para nanopartículas com 20% de carga. (b) RDFs para nanopartículas com 100% de carga.



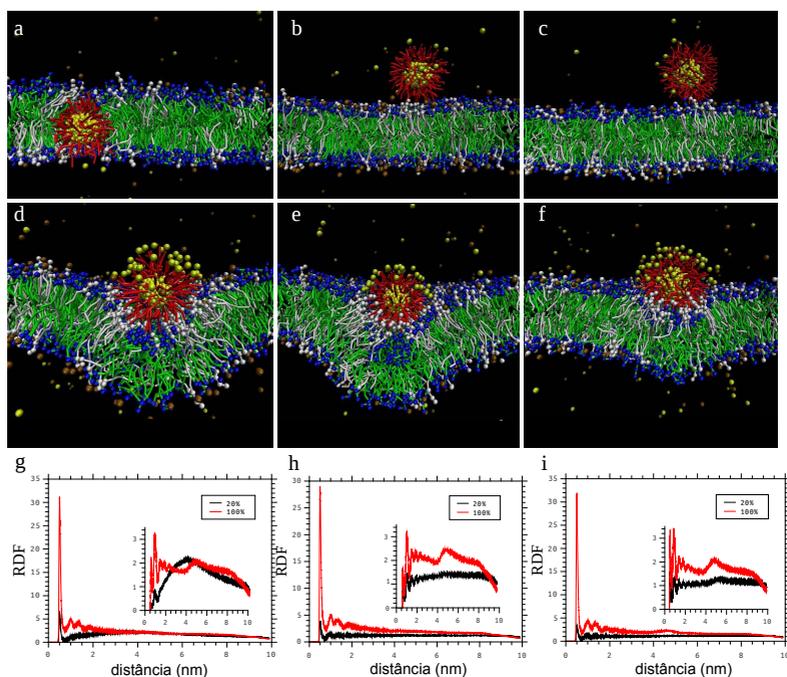
aos estágios iniciais da endocitose. De fato, simular endocitose em nível molecular está muito além de qualquer abordagem de simulação molecular atualmente disponível.

### 3.2.2 Efeito do tamanho do ligante

O efeito do comprimento do ligante também foi explorado utilizando simulações de dinâmica molecular "coarse-grained". Três ligantes foram considerados: 1-octanotíol, 1-dodecanotíol e 1-hexadecanotíol. Simulações destes sistemas com densidades de carga de 20 e 100% foram executadas e os resultados sugerem uma relação interessante entre densidade de carga e o

comprimento dos ligantes. A Figura 7 (a)-(f) mostra snapshots destes sistemas após simulações de 100ns.

Figura 7: Efeito do comprimento do ligante e carga de superfície em interações nanopartícula-célula. (a), (b) e (c) apresentam nanopartículas com 20% de carga e ligantes 1-octanotiol, 1-dodecanotiol e 1-hexadecanotiol, respectivamente. (d), (e) e (f) mostram nanopartículas com 100% de carga e os mesmos ligantes previamente citados. (g), (h) e (i) mostram funções de distribuição radial entre os terminais catiônicos da nanopartícula e grupos negativamente carregados da membrana. Insets mostram RDFs para os terminais catiônicos da nanopartícula e grupos positivamente carregados da membrana.



O comportamento de nanopartículas funcionalizadas com 1-octanotiol com 20 e 100% de carga foi descrito nas seções anteriores. No entanto, para nanopartículas funcionalizadas com 1-dodecanotiol ou 1-hexadecanotiol com uma densidade de carga de 20% é distinto, Figura 7(b) e (c), comparado com a Figura 7(a). Na Figura 7(g), foram calculadas RDFs para os ligantes (1-octanotiol) da nanopartícula e grupos fosfato da biomembrana para as densi-

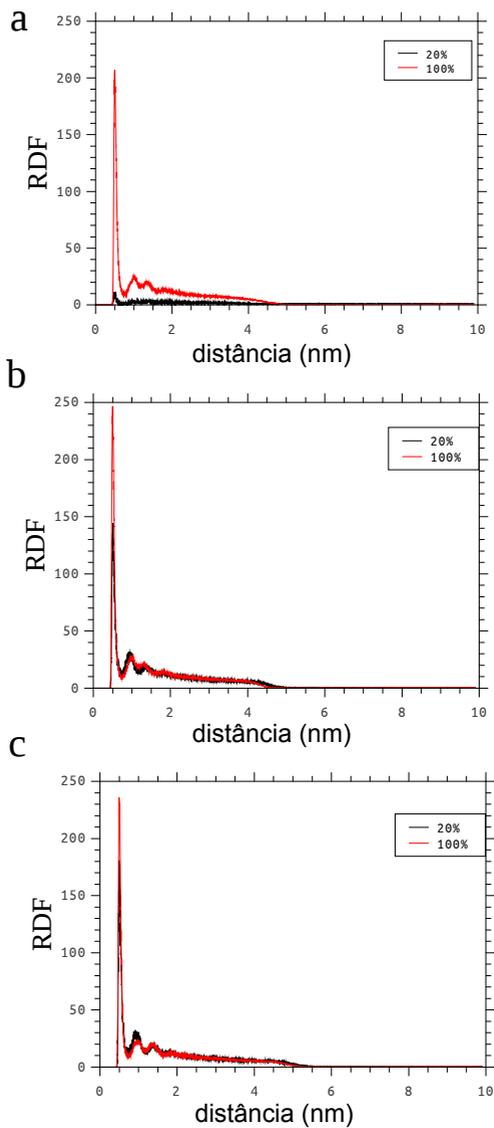
dades de carga de 20 e 100%. Comparando as intensidades relativas dos picos próximos a 0,25 nm é possível constatar que interações eletrostáticas mais fortes existem para a nanopartícula com 100% de carga do que para 20%, como esperado. Entretanto, devido à translocação da nanopartícula para o interior hidrofóbico da membrana, um pico é observado em ambos os casos. Os insets mostram RDFs para os ligantes catiônicos das nanopartículas e os grupos "choline" positivos da bicamada. As intensidades relativas sugerem que os grupos fosfato (negativos) da membrana interagem mais fortemente com os ligantes catiônicos na superfície da nanopartícula do que com os grupos "choline" (positivos), sugerindo que interações eletrostáticas são importantes na determinação dos mecanismos de interação de membranas celulares com nanopartículas. Comportamentos similares foram observados nas Figuras 7(h) e (i).

Embora grupos fosfato da membrana apresentem interações similares para nanopartículas com 20 e 100% de carga, um comportamento ligeiramente diferente foi observado na interação entre os terminais catiônicos da nanopartícula e os contra-íons  $\text{Cl}^-$  adicionados para conferir eletroneutralidade aos sistemas. Analisando as funções RDFs na Figura 8 é possível observar que o comprimento do ligante possui um papel importante em determinar as interações com contra-íons quando densidades de carga de 20% são utilizadas, em que a intensidade do pico é significativamente mais baixa do que a RDF para nanopartículas com 100% de carga (Figura 8(a)).

A translocação favorável observada para nanopartículas funcionalizadas com 1-octanotiól e 20% de carga pode estar relacionada a interações eletrostáticas fracas existentes entre os terminais catiônicos da nanopartícula e os contra-íons, enquanto mantendo interações significativas com grupos fosfato negativamente carregados da bicamada lipídica Figura 7(g). Nanopartículas funcionalizadas com 1-dodecanotiól e 1-hexadecanotiól não exibem uma tendência para penetrar a membrana, possivelmente devido a interações significativas com contra-íons, conforme evidenciado na Figura 8(b) e (c), demonstrando interações fracas com grupos fosfato, Figura 7(h) e (i). No entanto, 100% de carga induz interações eletrostáticas mais fortes levando à redução da área de superfície da membrana, restauração da espessura da membrana e envolvimento da nanopartícula. Isto é observado para todos os sistemas com 100% de carga porém não tão evidentemente para o ligante 1-hexadecanotiól.

Nanopartículas funcionalizadas com ligantes maiores exibem um raio efetivo maior, que promove interações mais fortes com contra-íons em solução e a redução da força de interação com a bicamada lipídica, quando densidades de carga baixas são utilizadas. Embora previamente demonstrado que ligantes maiores são mais efetivamente envolvidos por uma bicamada lipídica utilizando simulações de DPD (DING; MA, 2012b), as simulações realizadas

Figura 8: Funções de distribuição radial para os terminais catiônicos e contra-íons CL<sup>-</sup> utilizando os ligantes (a) 1-octanotíol, (b) 1-dodecanotíol e (c) 1-hexadecanotíol.



nesta tese demonstram que isto somente ocorre quando densidades de carga maiores são utilizadas, onde interações nanopartícula-membrana são, de fato, mais fortes. Quando baixas densidades de carga são utilizadas, ligantes maiores não favorecem nem translocação nem envolvimento da nanopartícula. Portanto, um raio efetivo maior não é condição suficiente para induzir o envolvimento da nanopartícula, como concluído em estudos anteriores (DING; MA, 2012b). Assim, em partículas com um raio efetivo maior, é mais provável que um número maior de contra-íons irá interagir com os ligantes, criando um efeito de "escudo" (shielding) eletrostático, impedindo a penetração da nanopartícula. Avaliando as trajetórias de simulação, foi observado que contra-íons exibem interações mais fracas com nanopartículas funcionalizadas com ligantes menores, comparado a nanopartículas com ligantes maiores antes da adsorção e translocação. Estas interações fracas permanecem após a translocação da nanopartícula para ligantes menores e se tornam mais evidentes para ligantes maiores após adsorção, induzindo o envolvimento da nanopartícula. Juntos, estes resultados sugerem não somente um mecanismo plausível no qual tanto densidade de carga quanto o comprimento do ligante afetam interações nanopartícula-membrana, mas também como isto afeta a dinâmica e estrutura da membrana.

### 3.3 MODELANDO INTERAÇÕES NANOPARTÍCULA-CÉLULA

O interesse desta pesquisa foi investigar como a química de superfícies poderia influenciar a internalização de nanopartículas pelas células. Simulações utilizando nanopartículas com baixas densidades de carga apresentam tendências de interação consistentes com simulações utilizando dendrímeros (LEE; LARSON, 2006), onde um nanoporo foi formado na membrana. Estes resultados sugerem uma estratégia para "escapar" de vias endocitóticas, favorecendo a translocação passiva através da bicamada lipídica e induzindo rupturas na membrana, que talvez não comprometam viabilidade celular. Nanopartículas que penetram membranas celulares frequentemente são "aprisionadas" em lisossomos e estes materiais precisam de um mecanismo para promover escape lisossomal, que é crucial para aplicações de entrega de fármacos e genes.

Nanopartículas com baixas densidades de carga apresentam toxicidade reduzida e ligação não-específica ocorre em menor extensão do que projetos de química de superfície baseados em densidades de carga mais altas. Em aplicações biomédicas, o balanço entre eficiência de internalização e toxicidade precisa ser considerado. Portanto, nanopartículas com baixas densidades de carga poderiam satisfazer estes requerimentos. No entanto, as simula-

ções aqui apresentadas sugerem que ligantes com diferentes comprimentos afetam significativamente a translocação de nanopartículas. Embora nanopartículas funcionalizadas com 1-octanotiol e 20% de carga são capazes de penetrar a membrana, para a mesma densidade de carga, 1-dodecanotiol e 1-hexadecanotiol não apresentam tal comportamento. Portanto, nanopartículas funcionalizadas com 1-octanotiol e baixas densidades de carga favoreceriam a translocação passiva através de membranas celulares evitando a necessidade de projetar mecanismos de escape lisossomal.

Por outro lado, densidades de carga intermediárias não apresentaram comportamentos de adsorção diferentes. A tendência observada indica que densidades de carga maiores tendem a induzir o envolvimento da nanopartícula. Este comportamento é consistente com simulações de DPD (VÁCHA; MARTINEZ-VERACOECHEA; FRENKEL, 2011) e apresenta semelhanças com os processos iniciais de endocitose, embora receptores de membrana não tenham sido utilizados nas simulações. Para 100% de carga todos os ligantes considerados envolveram a nanopartícula embora este efeito tenha sido menos significativo para 1-hexadecanotiol.

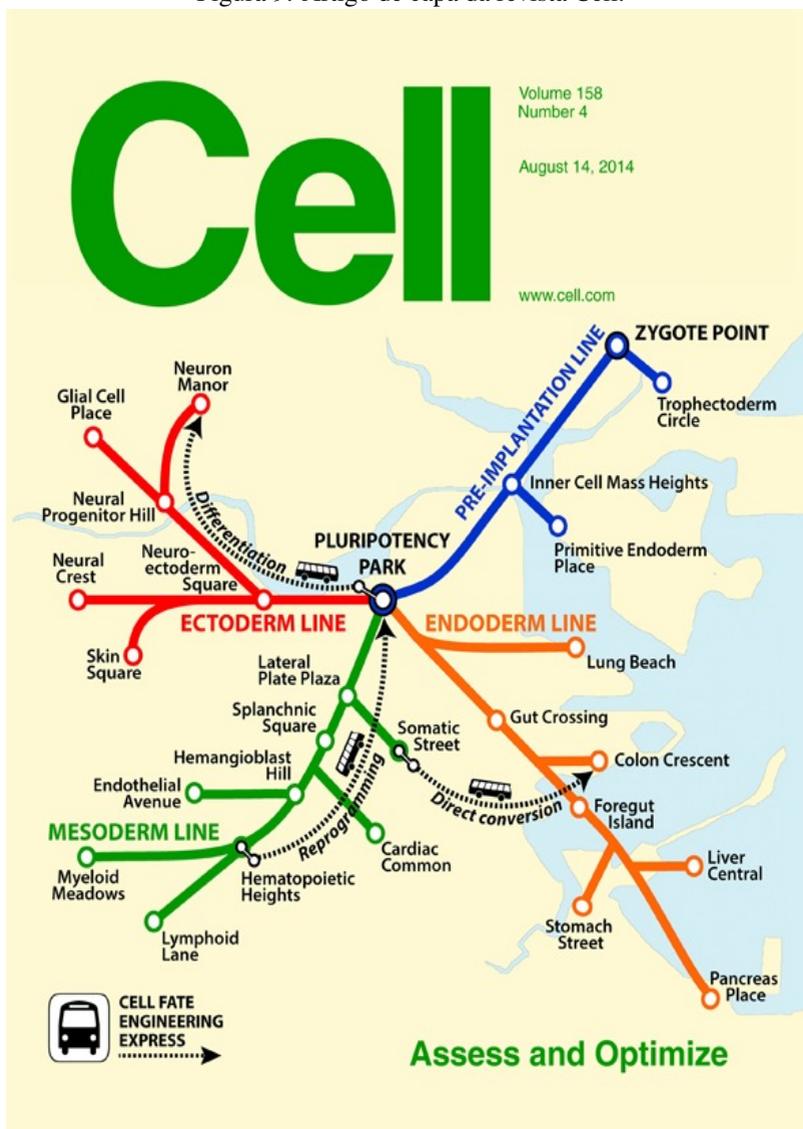
Com base nos resultados apresentados, nanopartículas com altas densidades de carga podem ser internalizadas por células utilizando vias endocitóticas mais prontamente do que nanopartículas com baixas densidades de carga. Embora outros estudos sugeriram que nanopartículas com altas densidade de carga tendem a alterar a integridade da membrana mais significativamente, quando concentrações mais baixas de nanopartículas são utilizadas, o envolvimento da nanopartícula pode ser favorecido e rupturas em domínios da membrana podem ser reduzidas. Assim, embora nestes casos a ligação não-específica de proteínas possa ser significativa, um projeto adequado de química de superfícies poderia superar este problema e expor cargas positivas somente na interface célula tumoral-nanopartícula (POON et al., 2011). Internalização seria então favorecida, reduzindo a ligação não-específica e a toxicidade sistêmica.

A complexidade de sistemas *in vivo* utilizados para avaliar terapias baseadas em nanomateriais está motivando convergência entre diversas áreas de pesquisa. Utilizando simulações moleculares, um entendimento mais completo das interfaces nano-bio está emergindo e princípios de projeto estão começando a ser delineados. Devido às múltiplas escalas espaço-temporais, de aspectos moleculares à sistêmicos, uma abordagem multi-escala é necessária para buscar uma melhor compreensão do comportamento de nanomateriais em sistemas biológicos. Combinando simulações com pesquisa experimental pode levar a novos "insights" em nanobiotecnologia.



## 4 DESCRIÇÃO DA PLATAFORMA CELLNET

Figura 9: Artigo de capa da revista Cell.



Neste capítulo serão apresentados partes dos resultados do artigo publicado na revista *Cell* (CAHAN et al., ):

Cahan, Patrick.\* ; Li, Hu\* ; Morris, Samantha\* ; Rocha, Edroaldo Lummertz da ; Daley, G. Q. ; Collins, J. J. . *CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering*. \*Estes autores contribuíram igualmente. **Cell (Cambridge)**, v. 158, p. 903-915, 2014.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Transições entre tipos celulares são fundamentais durante o desenvolvimento embrionário, fisiologia e patologia. Direcionar transições de estado *in vitro* é uma preocupação atual na área de biologia de células-tronco uma vez que as células derivadas podem ser utilizadas para investigar tipos celulares inacessíveis durante o desenvolvimento embrionário e doenças, para *screening* de fármacos e terapias celulares regenerativas. Transições de estado celular têm sido alcançadas *in vitro* e *in vivo* por meio da expressão forçada de fatores de transcrição. Por exemplo, células somáticas tais como fibroblastos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), queratinócitos (AASEN et al., 2008), células do sangue periférico (LOH et al., 2010; STAERK et al., 2010) e progenitores neurais (KIM et al., 2009) têm sido reprogramadas para células-tronco pluripotentes. Fibroblastos têm sido convertidos em células semelhantes à mioblastos (DAVIS; WEINTRAUB; LASSAR, 1987), neurônios motores (VIERBUCHEN et al., 2010), cardiomiócitos (IEDA et al., 2010), hepatócitos (HUANG et al., 2011; SEKIYA; SUZUKI, 2011) e progenitores sanguíneos (SZABO et al., 2010). Células B têm sido convertidas em macrófagos (XIE et al., ) e células do pâncreas têm sido convertidas *in vivo* em células produtoras de insulina (ZHOU et al., 2008). Além disso, células-tronco pluripotentes podem ser diferenciadas para linhagens específicas por meio de uma combinação de condições de crescimento e expressão ectópica de genes (MURRY; KELLER, 2008).

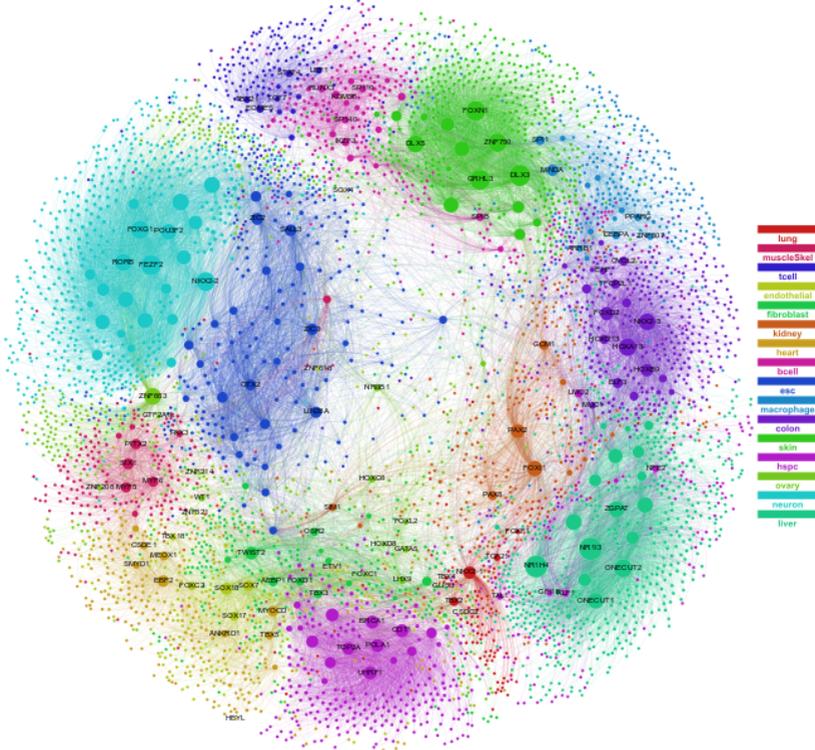
A prática de engenharia celular tem levantado questões importantes sobre o relacionamento das células derivadas com suas correspondentes *in vivo*. Por exemplo, qual a extensão das similaridades moleculares e funcionais existentes entre a população de células derivadas e a população celular ou tecido alvo de interesse? Enquanto complementação funcional via transplantação em animais tem sido utilizada para avaliar a habilidade das células derivadas para mimetizar a fisiologia de suas correspondentes *in vivo*, tais experimentos são tecnicamente desafiadores, carecem de rigor quantitativo e fornecem "insights" limitados ao determinar a função de tecidos humanos em hospedeiros animais. A similaridade molecular das populações derivadas é

tipicamente avaliada por PCR semi-quantitativo, perfilagem de expressão de genes baseada em *microarrays* ou sequenciamento de RNA seguido por análise de clusterização. No entanto, tais análises globais não fornecem nem mecanismos intuitivos e quantitativos para determinar as deficiências das células derivadas nem um método sistemático para priorizar intervenções visando melhorar a qualidade das populações celulares derivadas.

Nesta parte do trabalho, uma plataforma computacional baseada em biologia de redes foi desenvolvida (CellNet) que avalia a fidelidade de conversões de destino celular e gera hipóteses específicas buscando gerar populações de células derivadas de alta qualidade. A construção e aplicação desta plataforma para diferentes tipos de células e tecidos humanos e de camundongo é descrita em (CAHAN et al., ; MORRIS et al., ) assim como a sua utilização para avaliar os resultados de 56 artigos publicados na área de reprogramação de células somáticas para células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), diferenciação dirigida e conversão direta entre células somáticas. Com base nestas análises, foi possível constatar quantitativamente que reprogramação é a estratégia mais eficiente comparada a outras abordagens de conversões de destino celular. Realmente, CellNet confirma que iPSCs são virtualmente indistinguíveis de células-tronco embrionárias (ESC) em termos do estabelecimento de redes reguladoras de genes (GRNs). Também foi demonstrado que neurônios e cardiomiócitos derivados por diferenciação dirigida de células-tronco pluripotentes estabelecem mais completamente as respectivas GRNs de células e tecido-específicas do que neurônios e cardiomiócitos diretamente convertidos a partir de fibroblastos. A Figura 10 ilustra a GRN em escala genômica reconstruída para células humanas enfatizando sub-redes célula- e tecido específicas.

A análise de cardiomiócitos convertidos a partir de fibroblastos cardíacos *in situ* demonstra que o microambiente *in vivo* fornece sinais seletivos/indutivos que levam a um estabelecimento mais completo das GRNs governando a "identidade" do tecido do coração. Também foi demonstrado que GRNs da população de células inicial são detectáveis nas populações de células derivadas e purificadas em ambos os experimentos de diferenciação dirigida e conversão direta, e também que o estabelecimento de GRNs indesejadas é comum em virtualmente todos os paradigmas de engenharia celular. Portanto, CellNet fornece uma plataforma para avaliar e otimizar esforços em engenharia celular. Neste capítulo, a construção e validação desta plataforma é descrita de forma sucinta e a aplicação para cardiomiócitos derivados *in situ* a partir de fibroblastos cardíacos destaca a importância do microambiente tecidual em recapitular programas de expressão de genes *in vivo*. Estas análises foram escolhidas para este capítulo, uma vez que possibilitam estabelecer algumas analogias com o desenvolvimento de biomateriais como plataformas

Figura 10: Rede reguladora de genes reconstruída a partir de dados de expressão de genes provenientes de 16 tipos de células e tecidos humanos.

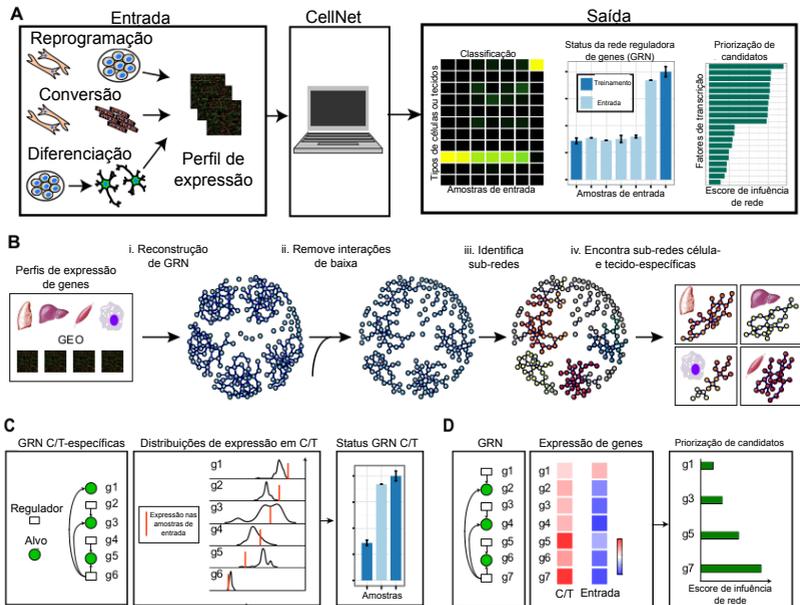


de cultura celular.

#### 4.2 CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA CELLNET

CellNet é baseado na descoberta de redes reguladoras de genes (GRNs), que governam os programas de expressão de genes de um tipo particular de célula, assim como sua resposta transcricional ao ambiente, doenças e envelhecimento. Desta forma, GRNs atuam como os principais determinantes moleculares da identidade celular (DAVIDSON; ERWIN, 2006). Assim, quantificar o estabelecimento de GRNs célula- e tecido-específicas (C/T) nas populações derivadas poderia servir tanto como uma métrica robusta de identidade celular quanto uma ferramenta para identificar componentes regula-

Figura 11: Construção e validação da plataforma CellNet. (A) CellNet foi projetado para analisar perfis de expressão de genes de células modificadas por reprogramação para a pluripotência, por conversão direta entre células somáticas ou por diferenciação dirigida de células-tronco com pluripotência induzida. Basicamente, CellNet é capaz de classificar amostras de entrada em tipos de células e tecidos pré-estabelecidos, quantificar a extensão na qual GRNs célula e tecido-específicas são estabelecidas nas amostras de entrada e atribuir escores para reguladores transcripcionais de acordo com a probabilidade de que modificar sua expressão resultará em um melhor estabelecimento da GRN de interesse. (B) CellNet é baseado em GRNs célula- e tecido específicas reconstruídas a partir de dados de expressão de diversas células e tecidos e sujeitas à uma variedade de perturbações. (C) Utilizando um perfil de expressão de genes para quantificar o status ou estabelecimento de GRNs.(D) Combinando expressão de genes com GRNs para priorizar reguladores transcripcionais e aperfeiçoar a qualidade das populações de células derivadas.



dores aberrantemente expressos. CellNet foi projetado para avaliar perfis de expressão de genes quantificando a extensão na qual GRNs C/T são estabelecidas, classificar as amostras de entrada por sua similaridade com a população de células de interesse e priorizar reguladores transcricionais de acordo com sua probabilidade de melhorar a população celular derivada, Figura 11(A).

Um *pipeline* foi elaborado para reconstruir GRNs utilizando 3,419 perfis de expressão de genes publicamente disponíveis de diversos tipos de células e tecidos incluindo células-tronco embrionárias(ESC), ovário, testículos, neurônios, glia, pele, coração, músculo esquelético, fibroblastos, adipose branca, rins, células endoteliais, células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, células B e T, macrófagos, pulmão, fígado, pâncreas, intestino delgado e cólon, Figura 11(B). As plataformas de microarray Affymetrix 430.2 e HG133.2 foram utilizadas para reconstruir GRNs de camundongo e humanas, respectivamente, porque estas plataformas contém o maior número de células e tecidos perfilados assim como um número significativo de perturbações de rede. Um censo da base de dados Gene Expression Omnibus (GEO) foi realizado para determinar o número de *microarrays* que perfilaram tipos de células e tecidos bem anotados, encontrando 20 tipos de células e tecidos de camundongo que foram representados por pelo menos 100 perfis de expressão de genes e 16 tipos de células e tecidos humanos representados por pelo menos 60 perfis de expressão de genes, já que a performance das GRNs reconstruídas com poucos perfis de expressão é substancialmente reduzida.

Para reconstruir GRNs, um número equivalente de perfis de cada número de acesso GEO e cada C/T foram aleatoriamente selecionados, assegurando que cada C/T foi representada por um mínimo de 10 condições distintas, que atuam como perturbações, que possibilitam a reconstrução de GRNs. Após integrar estas amostras em um único conjunto de dados, GRNs foram reconstruídas utilizando uma versão modificada do algoritmo *Context Likelihood of Relatedness* (CLR) (FAITH et al., 2007), que essencialmente utiliza uma medida de correlação para inferir relacionamentos de regulação entre reguladores transcricionais e os genes alvo. Então, componentes destas GRNs que são célula- e tecido-específicos foram determinados. Redes complexas são constituídas por comunidades ou sub-redes nas quais vértices (por exemplo, genes) são mais fortemente conectados um ao outro do que com vértices em outras sub-redes. Aplicando o algoritmo de detecção de comunidades InfoMap, 1,787 e 2,315 sub-redes foram encontradas nas GRNs de camundongo e humanas, respectivamente. Então, utilizando análise de enriquecimento de grupos de genes (*gene set enrichment analysis*), 94 e 76 sub-redes célula- e tecido-específicas foram encontradas nas GRNs de camundongo e humanas, Figura 11(B) e Figura 10, para uma representação da GRN de células humanas, com sub-redes C/T específicas representadas com diferentes cores.

Para identificar quais sub-redes falham em ser estabelecidas ou são aberrantemente estabelecidas nas células derivadas, uma métrica para determinar o status do estabelecimento de GRNs dado um perfil de expressão de genes foi desenvolvida, Figura 11(C). Esta métrica é definida como a proximidade da expressão de cada gene em uma GRN com o seu valor esperado ponderada pela importância de cada gene para a rede e para os classificadores C/T específicos associados. Então, para priorizar reguladores transcricionais para otimização de engenharia celular, um Escore de Influência de Rede (EIR) foi desenvolvido, o qual integra o nível de expressão do regulador na C/T alvo, a extensão da desregulação do regulador e seus alvos preditos na amostra em análise, assim como o número de alvos preditos Figura 11(D). CellNet é publicamente disponível com uma aplicação web (<http://cellnet.hms.harvard.edu>) onde visitantes podem fazer o download do software para executarem localmente em seus computadores ou fazer o upload de seus dados de expressão para serem processados nos servidores da Universidade de Harvard. A aplicação web permite aos usuários pesquisar por alvos preditos de fatores de transcrição e encontrar reguladores preditos de genes específicos.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE CULTURA CELULAR UTILIZANDO CELLNET

Nesta seção, serão apresentados alguns resultados e limitações atuais da plataforma CellNet. Pode ser antecipado que os classificadores de tipos de células e tecidos poderiam ser limitados em dois aspectos. Primeiro, tecidos representam populações heterogêneas de células enquanto a meta da engenharia de células-tronco é frequentemente a produção de uma população celular contendo apenas um tipo específico de célula alvo. Segundo, a vasta maioria dos dados de treinamento foi derivada a partir de células e tecidos primários, enquanto a maioria das tentativas de engenharia de populações celulares são realizadas *in vitro*. Isto é particularmente uma vantagem ao analisar tecidos tumorais de pacientes, conforme será apresentado no capítulo 6. Para abordar como estes efeitos de heterogeneidade tecidual influenciam o desempenho da plataforma, CellNet foi aplicado a cardiomiócitos primários purificados com base em um reportador para a expressão de "alpha myosin heavy chain"(aMHC) (IEDA et al., 2010), a neurônios "nociceptor" dissecados e purificados baseado na expressão de Nav1.8 (CHIU et al., 2013) e também neurônios "dopaminérgico" humanos microdissecados por captura a laser (ZHENG et al., 2010).

Cardiomiócitos de camundongo purificados são exclusivamente identificados como "coração"(heart), Figura 12(A) e atingem um status da GRN do coração superior a 90%, Figura 12(B). O tecido cardíaco é constituído por fibroblastos, endocárdio, tecido vascular além de células musculares cardíacas, porém, a despeito da natureza heterogênea dos dados de treinamento para o coração, a função de classificador da plataforma CellNet acuradamente determinou o tecido de origem destas amostras de cardiomiócitos purificados. Esta análise também explica porque tecidos como o tecido muscular esquelético, que compartilha propriedades funcionais com o tecido cardíaco, por exemplo, contração baseada em miosina, ou pulmão que compartilha características composicionais em termos celulares, por exemplo, células endoteliais, mostram maiores níveis de estabelecimento das GRNs do coração quando comparados a outros tipos de células e tecidos. Esta análise sugere a existência, ao menos em parte, de programas de expressão de genes similares entre estes tecidos, coração, muscular esquelético e células endoteliais, Figura 12(B).

Quando CellNet foi aplicado para analisar neurônios *nociceptor*, constatou-se que as amostras foram classificadas fortemente como neurônios (neuron), Figura 12(C) (escore de classificação = 0.792) e alcançaram um alto status da GRN de neurônios, Figura 12(D). Finalmente, ao analisar as amostras de neurônios *dopaminergic*, constatou-se a obtenção de altos escores de classificação (0.887), Figura 12(E), e um alto nível de estabelecimento da GRN dos neurônios, Figura 12(F). Estas análises sugerem que a despeito da heterogeneidade composicional dos dados de treinamento, CellNet é capaz de acuradamente classificar tipos específicos de células de acordo com o tecido a partir dos quais eles foram derivados.

Para avaliar como os efeitos de cultura celular influenciam o desempenho de CellNet, perfis de expressão de neurônios corticais (PENG et al.,2012)

---

Figura 12 (*Figura na próxima página*): Análise de células primárias purificadas e células cultivadas. Classificação de células e tecidos (A) e status da GRN do coração (B) de cardiomiócitos primários purificadas por FACS. Classificação (C) e status da GRN de neurônios (D) em diversos tipos de neurônios purificados com base na expressão de Nav1.8. Classificação (E) e status da GRN de neurônios (F) de neurônios humanos. Classificação (G) e status da GRN do fígado (H) de hepatócitos primários. (I) Caracterização de neurônios corticais.(J) Estabelecimento da GRN de neurônios primários cultivados. Barras em azul escuro representam o status da referida GRN no conjunto de treinamento. Azul claro representa o status das GRNs indicadas nas amostras de entrada e barras de erro representam o desvio padrão.

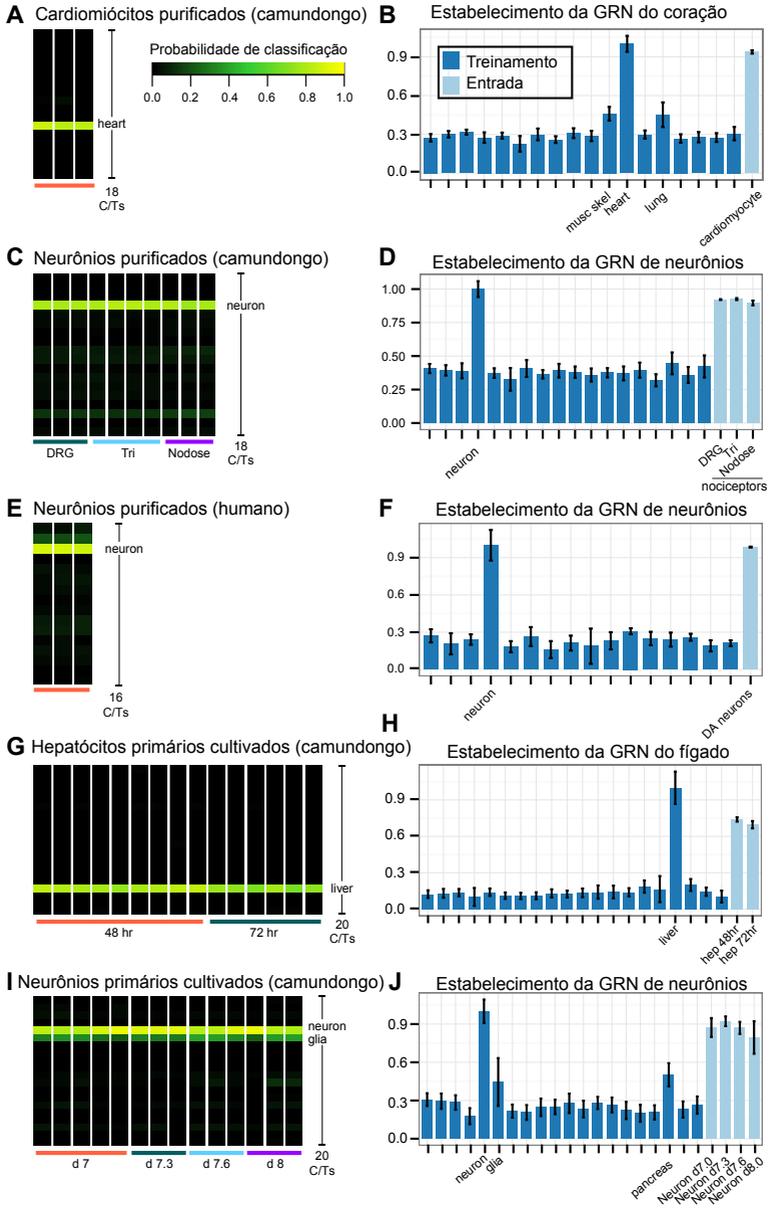
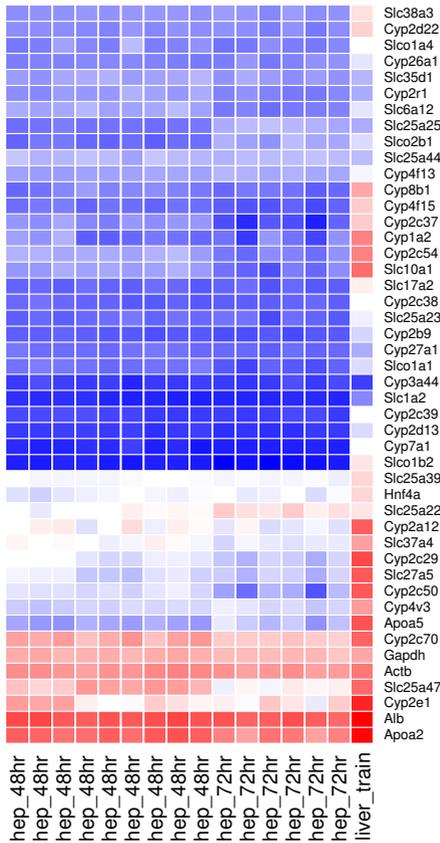


Figura 13: Expressão de genes marcadores de hepatócitos maduros em hepatócitos cultivados (primeiras 15 colunas) e no conjunto de dados de treinamento (última coluna, rotulada "liver-train"). Genes controle "housekeeping" são indicados com uma linha azul.



e hepatócitos (MAO et al., 2011), que foram cultivados *in vitro* antes da extração de RNA, foram analisados. Hepatócitos primários cultivados por três dias foram fortemente classificados como fígado (liver), Figura 12(G) e mantiveram um status de estabelecimento da GRN do fígado alto, 12(H). No entanto, como uma consequência da desdiferenciação conhecida de hepatócitos em cultura, CellNet indicou uma redução modesta no escore de classificação entre 48 e 72 horas. A Figura 13 mostra a expressão de genes marcadores de hepatócitos maduros em hepatócitos em cultura e no conjunto de treinamento

onde é possível verificar a redução da expressão de marcadores de hepatócitos maduros, Figura 13. Similarmente, neurônios cultivados por oito dias apresentam um escore de classificação alto (escore de classificação médio=0,870) e um alto estabelecimento da GRN de neurônios, Figura 12(I,J). As amostras neurais em cultura foram secundariamente classificadas como células gliais (escore de classificação médio=0,325), consistente com uma contaminação por células gliais nas células cultivadas. Os escores de classificação não mudam substancialmente por até oito dias de cultura, demonstrando que independente de possíveis efeitos de desdiferenciação devido à cultura celular, CellNet é sensível para detectar o estabelecimento da GRN de neurônios. Juntos, estes resultados sugerem que mudanças em expressão de genes induzida por cultura celular podem modestamente reduzir os escores de classificação embora não o suficiente para eliminar os escores de classificação das células primárias.

#### 4.4 ENGENHARIA DE CARDIOMIÓCITOS

Para avaliar a fidelidade relativa dos paradigmas de engenharia celular baseados em diferenciação dirigida e conversão direta para cardiomiócitos, CellNet foi utilizado para analisar perfis de expressão de genes de cardiomiócitos diferenciados a partir de ESC ou diretamente convertidos a partir de fibroblastos, como mostrado na Figura 14(A). Para fazer a comparação entre os dois paradigmas de engenharia celular tão justa quanto possível, as análises foram concentradas nas populações de células derivadas que apresentaram os melhores escores de classificação entre as pesquisas publicadas, visto que estes experimentos representam a fronteira do que é possível atualmente.

Então, CellNet foi aplicado para os melhores experimentos de diferenciação dirigida e conversão direta para cardiomiócitos murinos. Primeiramente, a diferenciação dirigida de ESCs de camundongo para cardiomiócitos foi analisada (CHRISTOFOROU et al., 2008). Neste experimento, "Células Progenitoras Cardíacas"(ESC-CPC) carregando um repórter GFP para expressão do gene coração-específico Nkx2.5 foi purificado por FACS e analisado após cinco, sete e oito dias de diferenciação dirigida, enquanto que cardiomiócitos derivados de ESC (ESC-CM) foram isolados após três semanas. Os ESC-CM foram primariamente classificados como "coração"(escore de classificação médio=0,568), Figura 14(A) e em menor extensão, como fibroblastos (escore de classificação médio=0,208). Além disso, a GRN de ESCs não foi completamente silenciada nem a GRN do coração completamente estabelecida, Figura 14(B). Estas células possuem escores de classificação menores do que cardiomiócitos neonatais purificados, Figura 12(A),

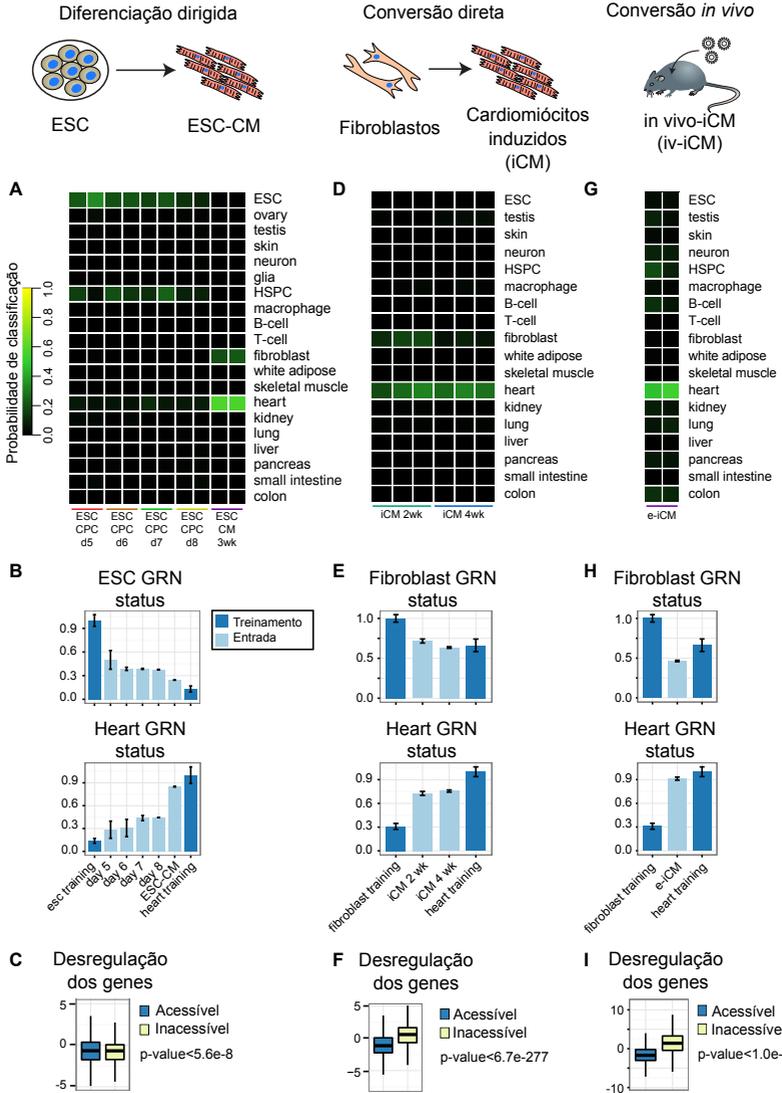
novamente indicando que o estabelecimento completo da identidade de cardiomiócitos não é uma consequência da heterogeneidade composicional ou qualquer outra inacurácia associada ao conjunto de dados de treinamento.

A ativação de GRNs de destinos celulares alternativos pode refletir a infidelidade da determinação de destino celular, impureza da população ou características transcricionais intrínsecas refletindo uma ontogenia desenvolvimental compartilhada. Constatou-se que a diferenciação dirigida de ESCs para cardiomiócitos parcialmente estabelece a sub-rede 1, associada a células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPC) em ESC-CPC (Figura 15(A)). Dado que ESC-CPC foram purificadas baseado em um repórter *Nkx2.5* e que uma população *Nkx2.5+* no embrião em desenvolvimento inclui uma população *CD41+* com potencial hemogênico definitivo, o estabelecimento da GRN HSPC é consistente com um modelo em que a "LATERAL PLATE MESODERM", o precursor desenvolvimental comum do coração e do sangue, emerge logo no início da diferenciação dirigida *in vitro*. Também observou-se o estabelecimento da GRN de fibroblastos em ESC-CM (Figura 15(B)), consistente com a classificação parcial destas amostras como fibroblastos, Figura 14(B). Interessantemente, o estabelecimento da GRN de fibroblastos foi também detectado em dois outros estudos independentes de ESC-CM (Figura 15(C)), que pode ser resultado de uma plasticidade desenvolvimental latente de ESC-CM derivados *in vitro* ou um artefato nas condições de cultura *in vitro*.

Como a GRN do coração não foi completamente estabelecida, Figura

---

Figura 14 (*Figura na próxima página*): Análise de cardiomiócitos de camundongo. (A) Heatmap de classificação de células e tecidos de um experimento de curso temporal da diferenciação dirigida de ESCs para cardiomiócitos. Células progenitoras cardíacas (CPC), cardiomiócitos derivados de ESCs durante três semanas de diferenciação (ESC-CM). (B) Status das GRNs de ESCs (acima) e do coração (abaixo) em CPCs e ESC-CMs comparado ao status da GRN dos dados de treinamento para ESCs e tecido cardíaco. (C) Z-scores de genes do coração indicando acessibilidade aos promotores destes genes. (D) Heatmap de classificação da população inicial de células (fibroblastos) e iCMs duas e quatro semanas após expressão ectópica dos transgenes. (E) Status da GRN de fibroblastos (acima) e do coração (abaixo) em fibroblastos e iCMs comparado ao status da GRN de fibroblastos e coração provenientes dos dados de expressão de treinamento. (F) Z-scores para genes do coração em iCMs. (G) Heatmap de classificação de iCMs induzidos *in vivo* (iv-iCMs). (H) Status das GRNs de fibroblastos (acima) e do coração (abaixo) em fibroblastos e iv-iCMs.



14(B), hipotetizou-se que a oclusão de promotores por nucleossomos poderia contribuir para a ativação incompleta de genes associados ao coração durante diferenciação dirigida e constatou-se que genes coração-específicos sem sítios de hipersensitividade para DNase em ESC foram mais desregulados em ESC-CMs do que genes coração-específicos com promotores acessíveis, Figura 14(C), dando suporte à conclusão de que a falta de acessibilidade à promotores de genes "cardíacos" evita um estabelecimento das GRNs de interesse em células diretamente diferenciadas e sugere que estratégias que levem a estados de cromatina mais acessíveis poderiam melhorar as eficiências dos paradigmas de engenharia celular atuais.

CellNet foi então aplicado para a conversão direta de fibroblastos cardíacos murinos para células semelhantes a cardiomiócitos (cardiomyocyte-like) (IEDA et al., 2010) via expressão ectópica de *Gata4*, *Mef2c* e *Tbx5*. Consistente com a capacidade funcional demonstrada por estas células (oscilações de  $Ca^{2+}$ , contração espontânea e potencial de ação intracelular), células das semanas 2 e 4 foram exclusivamente classificadas como "coração" (heart), Figura 14(D), embora com um escore de classificação menor do que cardiomiócitos diferenciados a partir de ESC (0,282 vs 0,568, respectivamente). Os escores de classificação menores para cardiomiócitos induzidos (iCMs) não são devido a falhas em silenciar a GRN de fibroblastos (realmente, a GRN de fibroblastos foi completamente silenciada) mas sim o estabelecimento incompleto da GRN do coração, Figura 14(E). Estes dados implicam que a barreira remanescente para estabelecer mais completamente a GRN do coração em iCM é a ativação incompleta de genes coração-específicos. Realmente, diversos reguladores de transcrição possuem baixos EIR em iCMs, sugerindo que manipulação destes fatores de transcrição poderia aumentar a eficiência da conversão direta para fenótipos cardíacos (Figura 15(A)). Estes fatores incluem genes conhecidos e que têm sido utilizados para melhorar a qualidade da indução de iCM (por exemplo, *Myocd*, *Nkx2-5* e *Hand2*) e outros genes associados ao coração que, de acordo com o nosso conhecimento, não têm sido testados em conversões diretas (por exemplo, *Gata6* e *Tbx20*).

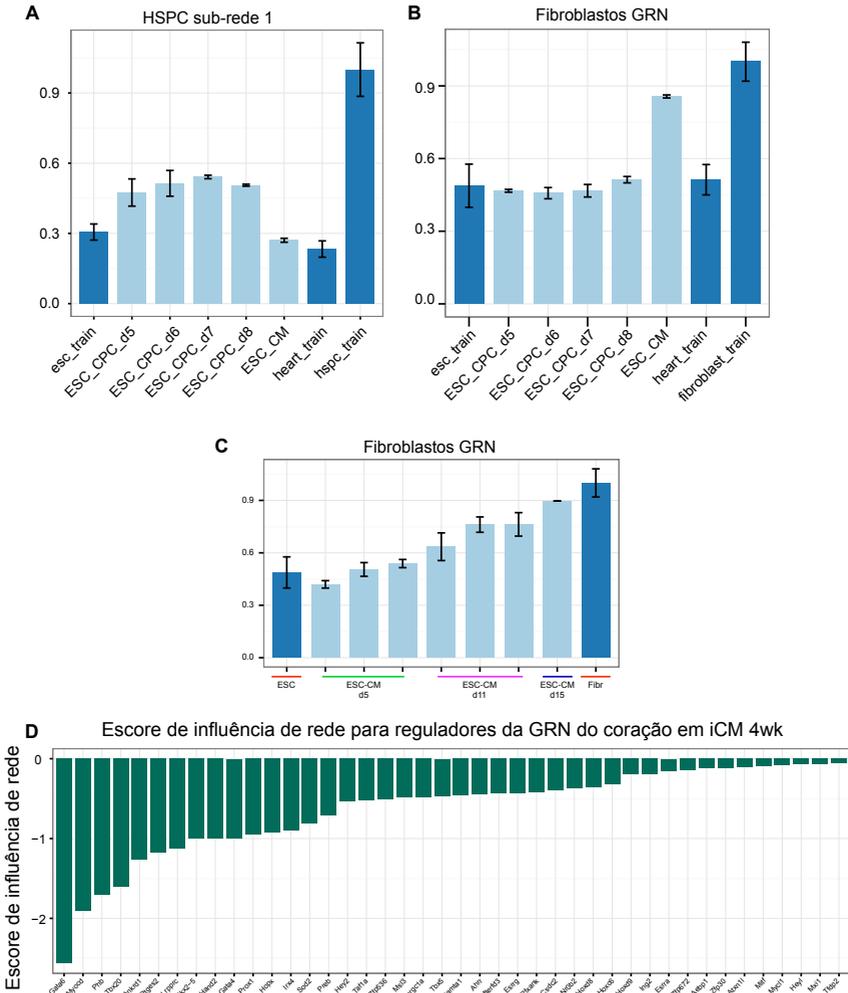
CellNet também identificou novos fatores de transcrição preditos como alvos prováveis para melhorar a indução de CM, incluindo *Phb*, que é sub-expresso como uma consequência de hipertrofia cardíaca, *Ankrd1* e *Lrpprc*. Analisando acessibilidade de promotores, constatou-se que genes coração-relacionados (genes com maior expressão no tecido do coração do que em fibroblastos) tendem a ser mais desregulados do que genes com promotores não acessíveis, Figura 14(F), implicando que a função primária do fator de transcrição *Gata4* em abrir cromatina inacessível é suficiente para ativar a expressão de genes coração-relacionados em populações diretamente converti-

das. No entanto, não está claro porque isto não resultou na ativação completa da GRN do coração.

Então, o papel do microambiente tecidual do coração de camundongos foi analisado para verificar se o mesmo é capaz de melhorar os escores de classificação e o estabelecimento da GRN do coração em iCMs que foram convertidos *in situ* a partir de fibroblastos cardíacos residentes, quando comparado a cardiomiócitos convertidos *in vitro* subsequentemente purificados e então perfilados (iv-iCM). Constatou-se que células iv-iCM possuem escores de classificação para o coração substancialmente maiores (escore=0,498 em iv-iCM vs 0,282 em iCM), Figura 14(G), associados com uma maior ativação da GRN do coração e o silenciamento completo da GRN de fibroblastos, Figura 14(H), consistente com a funcionalidade superior destas células (QIAN et al., 2008). Como em iCMs convertidos *in vitro*, foi observado que genes coração-relacionados com promotores acessíveis em fibroblastos são mais desregulados do que aqueles com promotores inacessíveis, sugerindo que a expressão de Gata4 é particularmente suficiente para ativar genes coração-relacionados, Figura 14(I). Importaneamente, análises baseadas em CellNet demonstram que o microambiente tecidual atua como um potencializador para a conversão direta de fibroblastos para o tipo de célula de interesse.

Portanto, uma plataforma computacional baseada na reconstrução de redes reguladoras de genes foi desenvolvida, que pode ser aplicada não somente para a área de células-tronco, mas também para qualquer área de pesquisa em biologia, em que é necessário compreender o comportamento celular em variadas condições. Particularmente, estas ferramentas analíticas desenvolvidas na plataforma CellNet estão sendo utilizadas para estudar diversos tipos de câncer, com ênfase particular em melanoma, e interações nanopartícula-célula assim como biomaterial-célula, desde que existam perfis de expressão de genes publicamente disponíveis nas condições experimentais de interesse. No próximo capítulo, CellNet foi aplicado para estudar interações nanopartícula-célula e biomaterial-célula com base em perfis de expressão de genes publicamente disponíveis. Como existem limitações na disponibilidade de dados de expressão de genes para algumas condições experimentais, o termo biomaterial na sentença biomaterial-célula refere-se a condições de cultura organóides, já que não foram encontrados dados disponíveis para células cultivadas em biomateriais tradicionais como colágeno ou alginato.

Figura 15: Estabelecimento de GRNs aberrantes em CPC-ESCs e ESC-CMs. (A) O status da GRN associada a sub-rede 1, representando células-tronco e progenitoras hematopoéticas e (B) GRN de fibroblastos durante a diferenciação dirigida de ESC de camundongo para cardiomiócitos. (C) Status da GRN de fibroblastos durante a diferenciação dirigida de ESC de camundongo para cardiomiócitos em outros dois estudos de diferenciação dirigida. (D) Escores de influência de rede (EIR) de reguladores transcricionais candidatos da GRN do coração. Escores menores que 0 indicam que o fator de transcrição precisar ser super-expresso nas células derivadas para estabelecer a GRN da célula alvo, cardiomiócitos neste caso.



## 5 INTERAÇÕES BIOMATERIAL-CÉLULA

### 5.1 INTRODUÇÃO

Nanomateriais induzem respostas imunológicas estimulatórias ou inibitórias dependendo de suas propriedades, tais como tamanho, morfologia e propriedades de superfície (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007; SMITH; SIMON; JR, 2013). Muitos trabalhos em nanotecnologia e biomateriais têm investigado como o controle destas propriedades em nanoescala pode levar a desenvolvimentos em vacinação terapêutica e agentes imunossupressivos, generalizando o entendimento atual das respostas imunológicas para além das bactérias e vírus, de tal forma que, atualmente, nosso sistema imunológico pode ser reprogramado para efetuar tarefas inimagináveis até recentemente.

Citando dois exemplos, um dos maiores obstáculos para terapias celulares é o rápido declínio em viabilidade e função das células transplantadas em imunoterapias anti-câncer (STEPHAN et al., 2010). Para isto, nanopartículas incorporando fármacos adjuvantes foram conjugadas na superfície de células T terapêuticas levando a melhoras significativas na eliminação de tumores em um modelo de terapia de células T adotivas. Esta estratégia também aumentou a taxa de repopulação de células-tronco hematopoiéticas em doses de fármacos adjuvantes muito menores e que foram inefetivas quando administradas sistemicamente (STEPHAN et al., 2010). Como segundo exemplo, biomateriais baseados em PLGA foram desenvolvidos para recrutar células dendríticas do paciente quando implantados sub-cutaneamente e reprogramar estas células para induzir respostas imune anti-tumorais contra melanoma (ALI et al., 2009).

Uma vez que estes materiais interagem com células do sistema imune e, possivelmente outros tecidos, seria importante elucidar quais mecanismos moleculares estão envolvidos nessas interações. Tal conhecimento possibilitaria a aplicação mais segura destes nano e biomateriais, assim como também encontrar outros mecanismos pelos quais estas respostas podem ser manipuladas. Seria particularmente interessante compreender como estas interações afetam programas de expressão de genes da célula. Para isto, a plataforma CellNet foi utilizada.

Como apresentado no capítulo anterior, CellNet permite aos usuários analisar seus próprios experimentos ou dados publicamente disponíveis. Neste capítulo, dados de expressão de genes publicamente disponíveis foram utilizados para a análise de alterações no transcriptoma de células PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) interagindo com nanopartículas de

ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos (KIM et al., 2012). Infelizmente, não existem muitos dados de expressão de genes disponíveis para interações nanomaterial-célula que poderiam ser analisados utilizando CellNet.

## 5.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO E RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS

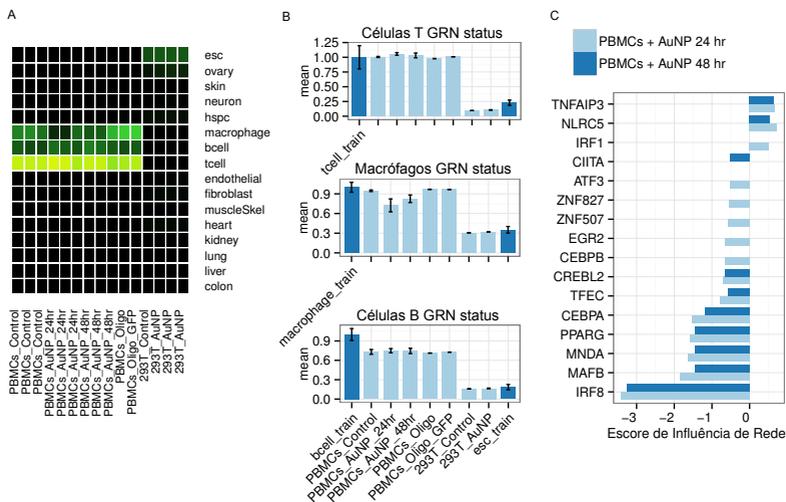
O experimento analisado nesta seção consiste de nanopartículas de ouro (AuNP) funcionalizadas com oligonucleotídeos interagindo com células PBMCs. AuNP foram incubadas com PBMCs por 24 e 48 horas e a expressão de genes foi determinada utilizando a plataforma de *microarray* HG133plus.2, para a qual a plataforma CellNet foi apropriadamente treinada, conforme descrito no capítulo anterior. Os autores, (KIM et al., 2012), também utilizaram a linhagem celular 293T, a qual foi incubada com AuNP por 48 horas. Oligonucleotídeos para EGFP foram conjugados na superfícies das nanopartículas.

Embora originalmente desenvolvido para a área de células-tronco, CellNet é uma plataforma geral para análise de identidade celular e expressão de genes. Portanto, o primeiro passo foi determinar a identidade das células PBMCs em consideração, visto que PBMCs podem constituir uma população heterogênea de células, incluindo células T, células B, macrófagos e, possivelmente, outras células. A Figura 16(A) apresenta um heatmap de escores de classificação da população celular de interesse (PBMCs) com relação a todos os tipos de células humanas presentes na plataforma CellNet.

Embora as PBMCs investigadas aqui possam conter outros tipos de células, dentro dos tipos de células disponibilizados por CellNet, elas são classificadas como células T, B e macrófagos, com escores de classificação maiores para células T, sugerindo que este pode ser o tipo celular predominante nas amostras de células PBMCs. A Figura 16(A) também apresenta os escores de classificação para as células 293T, classificadas como células-tronco, consistente com a sua origem embrionária (células embrionárias do rim). O estabelecimento das GRNs associadas a cada um destes tipos celulares foi então quantificado e é apresentado Figura 16(B).

Estas GRNs definem outra medida de identidade celular e capturam mudanças em programas de expressão de genes governando a identidade das células de interesse. Como pode ser observado, células T e macrófagos estabelecem completamente suas respectivas redes reguladoras de genes enquanto células B não o fazem. Isto sugere que células B podem estar em minoria na população de células analisadas ou que a população de células B perfilada compartilha programas de expressão com células T, o que não seria surpreendente dada as suas origens desenvolvimentais. Interessantemente, é possível observar que a GRN de macrófagos nas condições de tratamento com AuNPs

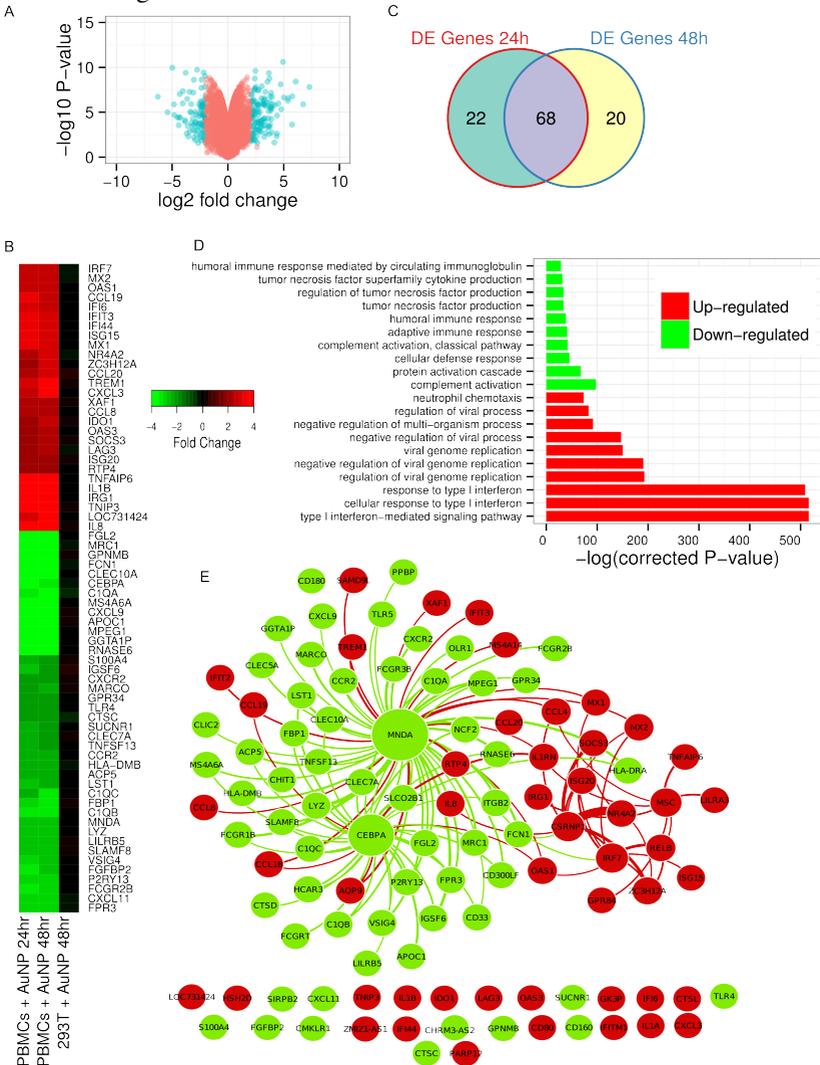
Figura 16: Caracterização das populações celulares contidas nas amostras de células PBMCs. (A) Heatmap de classificação das amostras PBMCs. (B) Estabelecimento das GRNs de células T, macrófagos e células B. (C) Escores de influência de rede para PBMCs incubadas com AuNP por 24 e 48 horas mostrando que genes envolvidos em transdução de sinal em células do sistema imune são afetados pela interação com nanopartículas.



por 24 e 48 horas apresentam uma redução em seus escores de estabelecimento, indicando mudanças transcricionais associadas a interação. Esta resposta ou está sendo mediada por macrófagos ou por sub-redes de interação transcricional compartilhadas entre células T e macrófagos onde tal sub-rede é responsável pela classificação de PBMCs como macrófagos. Em geral, é possível concluir que células do sistema imunológico estão sendo investigadas e que a interação com AuNP induz mudanças transcricionais no nível de redes reguladoras de genes.

Para verificar quais reguladores transcricionais são significativamente alterados em PBMCs quando da interação com AuNPs, Escores de Influência de Rede (EIR) foram calculados e são apresentados na Figura 16(C). Utilizando estes EIRs é possível estimar quais são os principais fatores de transcrição responsáveis pela variabilidade no estabelecimento das GRNs associadas a células T, B e macrófagos, Figura 16(B,C). Aparentemente, somente as GRNs associadas a macrófagos foram influenciadas pelo tratamento com AuNP após 24 e 48 horas. Dada a heterogeneidade populacional associada às PBMCs, não é possível afirmar se o tratamento com AuNP afeta somente

Figura 17: (A) Genes diferencialmente expressos (DEGs) ao comparar expressão de genes entre PBMCs controle e PBMCs incubadas com AuNP. (B) Heatmap mostrando DEGs para células PMBCs e 293T incubadas com nanopartículas (AuNP). (C) Sobreposição de DEGs para 24 e 48 horas de tratamento com AuNP. (D) Categorias funcionais (ontologia de genes) nas quais os DEGs se encontram. (E) Sub-rede ilustrando como os DEGs possivelmente interagem.



macrófagos. Estes resultados sugerem que AuNPs podem afetar GRNs associadas a células do sistema imune embora seu efeito em tipos celulares específicos não possa ser determinado para este experimento.

Quando aplicado para análise do transcriptoma de células sujeitas à engenharia de destino celular (Capítulo 4), EIR positivos indicam fatores de transcrição que deveriam ser inibidos enquanto EIR negativos indicam fatores de transcrição que deveriam ser super-expressos para atingir um nível de estabelecimento de suas GRNs comparável aos tecidos e células correspondentes *in vivo*. Neste contexto, os EIRs nos sugerem quais fatores de transcrição são significativamente afetados pelo tratamento com AuNP e poderiam representar alvos para modular os processos biológicos pelos quais eles são responsáveis. De fato, muitos destes fatores de transcrição estão envolvidos em processos importantes de transdução de informação em macrófagos, por exemplo, IRF1, IRF8, MAFB, CEBPA, TFEC e ATF3 enquanto que outros estão envolvidos no desenvolvimento de respostas inflamatórias (TNFAIP3) e respostas imune adaptativas contra patógenos (NLRC5 e CIITA).

Desta forma, genes diferencialmente expressos (DEGs) quando do tratamento com AuNP foram determinados e são apresentados na Figura 17. Na publicação original, (KIM et al., 2012), os autores analisaram a expressão diferencial de genes em células incubadas com nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos EGFP relativo a células incubadas com transfectantes lipídicos modificados com oligonucleotídeos EGFP ou sem tratamento algum. Os autores observaram mudanças de expressão entre estas condições e concluíram que o oligonucleotídeos EGFP, por si só, não foi o responsável pelas respostas celulares observadas. De forma consistente, na Figura 16(B), é possível observar que somente o tratamento com AuNP por 24 e 48 afetou o estabelecimento da GRN de macrófagos. Estas mudanças não ocorrem de forma tão evidente quando as células são tratadas somente com os oligonucleotídeos. Portanto, as análises de expressão diferencial que seguem são de células tratadas com AuNP funcionalizadas com oligonucleotídeos EGFP com relação às células PBMCs controle. Para esta análise, foram considerados como diferencialmente expressos genes apresentando mudanças de expressão duas vezes maior ou menor (em escala logarítmica) quando comparadas aos perfis de expressão nos controles ( $\log_2$  fold changes > 2), tanto sub-expressos como super-expressos e com valores P estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ), Figura 17 (A), em que os pontos azuis indicam os genes que satisfazem estes critérios.

A Figura 17(B) mostra a sobreposição de genes entre as condições de 24 e 48 horas. Um total de 110 genes foram encontrados como diferencialmente expressos dos quais 68 estão presentes em ambos pontos temporais, 22 genes são detectados exclusivamente nas primeiras 24 horas de tratamento e

20 genes são encontrados exclusivamente após 48 horas, Figura 17(C). Genes super-expressos estão em vermelho e sub-expressos em azul. A Figura 17(B) também apresenta os dados para as células 293T, indicando que não ocorreram mudanças significativas em expressão de genes nestas células, sugerindo um efeito específico para células do sistema imune, o que não é surpreendente devido às capacidades fagocitóticas de macrófagos.

Para determinar o conteúdo funcional desta lista de genes diferencialmente expressos, testes Chi-quadrado da sobreposição entre Processos Biológicos definidos na Ontologia Genes com relação a lista de genes diferencialmente expressos foram realizados, Figura 17(D). Genes super-expressos assumem papéis importantes para processos biológicos associados à resposta inflamatória, enquanto que genes inibidos são associados a respostas imunológicas. Portanto, AuNP funcionalizadas com olinucleotídeos alteram programas de expressão de genes consistentes com um papel em reprimir respostas imunológicas e induzir a criação de um microambiente inflamatório por meio de vias de sinalização mediadas por interferon.

Desde que GRNs em escala genômica foram reconstruídas durante o desenvolvimento da plataforma CellNet, uma sub-rede contendo os genes diferencialmente expressos foi construída para elucidar como estes genes se relacionam para induzir as respostas biológicas observadas, Figura 17(E). Consistente com a Figura 16(C), alguns reguladores transcricionais foram diferencialmente expressos, incluindo IRF7, CEBPA e MNDA.

Neste ponto, é importante ressaltar que o objetivo desta seção (e deste capítulo) não é analisar profundamente as implicações biológicas dos resultados aqui apresentados, visto que isto iria requerer validação experimental. O objetivo é demonstrar como biologia de sistemas e ciência dos materiais podem ser integradas com sucesso para estudar interações nanopartícula-célula.

### 5.3 CULTURAS ORGANÓIDES RECAPITULAM REDES REGULADORAS DE GENES ENDÓGENAS

O próximo passo foi determinar se a abordagem computacional desenvolvida, CellNet, poderia ser utilizada para investigar como condições microambientais, especialmente, condições de cultura celular bi ou tridimensionais poderiam contribuir com o estabelecimento de redes reguladoras de genes comparáveis àquelas observadas *in vivo*. Para isto, dados de expressão de genes publicamente disponíveis de queratinócitos em condições de cultura bidimensional (2D) e tridimensional (3D) foram analisados, comparando inicialmente seus escores de classificação e o estabelecimento de suas GRNs, Figura 18.

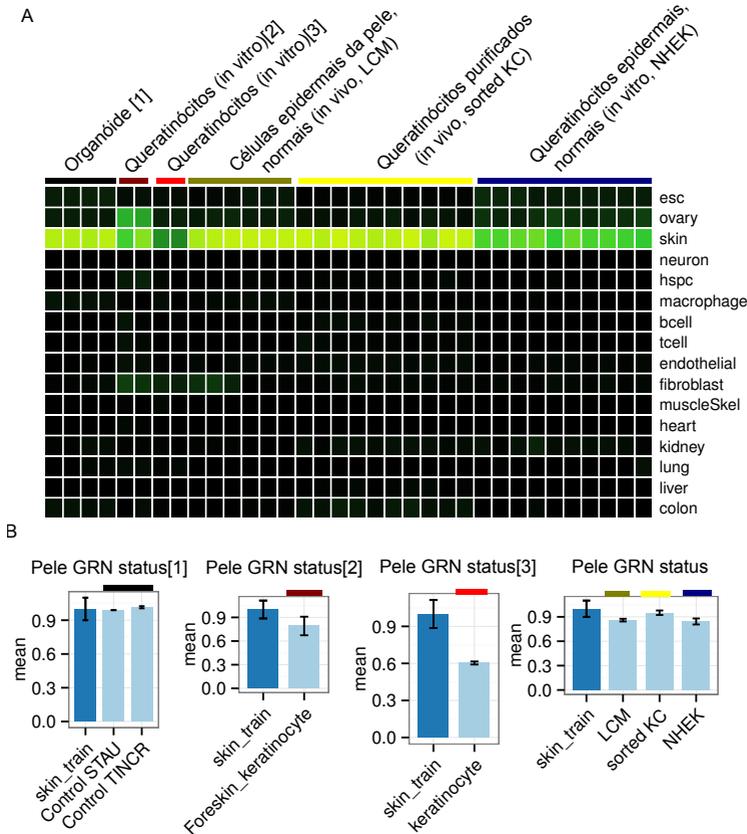
Para esta análise, primeiramente segue uma descrição das publicações

originais a partir das quais os dados foram obtidos. Para culturas de queratinócitos 3D, um modelo de epiderme humana organotípica foi utilizado, recapitulando tanto a estrutura quanto a expressão de genes da epiderme humana (KRETZ et al., 2013). Essas amostras aparecem identificadas como **Organoid** na Figura 18(A). As amostras identificadas como Keratinocyte[2] e Keratinocyte[3] são amostras de queratinócitos *in vitro*, utilizados em experimentos de reprogramação para pluripotência (AASEN et al., 2008; KIM; MOONEY, 2011). As amostras identificadas como "LCM", "sorted KC" e "NHEK" são provenientes de um mesmo experimento (KENNEDY-CRISPIN et al., 2012), no entanto, LCMs são anotadas como "células epidermais normais da pele, *in vivo*", "sorted KC" são queratinócitos purificados, também anotados como "*in vivo*" e NHEK são anotados como "queratinócitos epidermais humanos normais, *in vitro*". Portanto, as anotações presentes nestas amostras sugerem diferentes condições de cultura celular, organóide, *in vivo* e *in vitro*, e buscou-se determinar quais são as diferenças transcriptômicas entre estas amostras e o que seria esperado de uma GRN controlando programas transcricionais associados ao desenvolvimento/identidade da pele humana.

Estas amostras foram utilizadas para ilustrar as diferenças básicas entre células cultivadas em condições organotípicas, células primárias que foram isoladas e/ou purificadas e então perfiladas e células expandidas *in vitro*. É importante ressaltar que a análise aqui presente não é compreensiva no sentido de que não foram analisados todos os dados de expressão de genes disponíveis para queratinócitos e talvez existam queratinócitos mantidos em culturas 2D com qualidade comparável àqueles de culturas 3D ou anotados como "*in vivo*".

As Figuras 18(A,B) mostram as diferenças existentes tanto nos escores de classificação quanto nos escores de estabelecimento das GRNs destas células. Consistentemente, queratinócitos em culturas organotípicas apresentam altos escores de classificação (escore médio=0,809) assim como o estabelecimento da GRN representando a pele. É possível observar uma certa variabilidade para as outras amostras, contendo escores de classificação médio iguais a 0,614 as amostras de queratinócitos "Keratinocyte, *in vitro*[2]", 0,335 para "Keratinocyte, *in vitro*[3]", 0,996 para células anotadas como LCM, 0,830 "sorted KC" e 0,561 para queratinócitos expandidos *in vitro*. Além disso o estabelecimento da GRN refletindo a "identidade" da pele não foi atingido em algumas amostras e células anotadas como "*in vivo*" apresentaram escores de classificação e de estabelecimento da GRN da pele consistente. Estes resultados sugerem que condições de cultura organotípicas recapitulam programas de expressão de genes similares aqueles observados *in vivo*. Esta é a primeira vez que tais análises quantitativas sobre o impacto de condições de cultura/microambiente em programas de expressão de genes são realizadas.

Figura 18: Condições de cultura celular influenciam programas de expressão de genes. (A) Heatmap de classificação de queratinócitos em condições de cultura organóide, "in vivo" e "in vitro". Queratinócitos são classificados como pele ("skin"). (B) Estabelecimento de GRNs associadas a cada uma das amostras de queratinócitos. Barras coloridas horizontais acima dos gráficos em barra indicam a posição destas amostras no heatmap de classificação.



Análise de genes diferencialmente expressos entre as células cultivadas em culturas organotípicas e as células LCM, sorted KC e NHEK mostrou diferenças significativas sobre o número de genes afetados por estas condições de cultivo celular. Porém, ao contrário da análise de expressão realizada na seção anterior, procurou-se determinar as diferenças destas GRNs com a GRN "padrão" para a pele, reconstruída a partir de um compêndio de dados

de expressão de genes para o tecido "pele". O objetivo é determinar quais programas de expressão de genes falham ao ser estabelecidos ou são aberrantemente expressos em culturas organóides e 2D, de modo a verificar se uma abordagem baseada em biologia de sistemas seria útil para guiar o projeto, síntese e desenvolvimento de biomateriais para culturas de células biomiméticas.

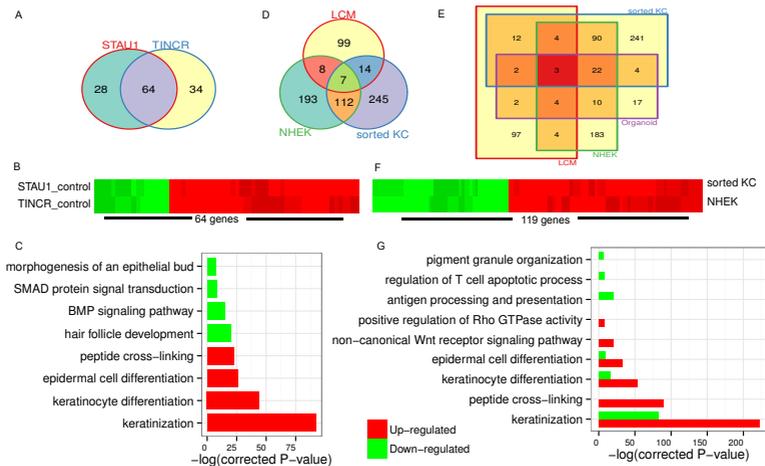
Primeiramente, genes diferencialmente expressos entre queratinócitos e a distribuição de expressão de genes pertencentes a GRN da pele definida em CellNet foram obtidos, ou seja, genes em queratinócitos cuja expressão desvia do valor esperado para expressão no conjunto de treinamento. Genes com z-score (basicamente, o z-score é o número de desvios padrão em que os dados desviam da média) maior ou menor que 3 foram considerados desregulados para garantir a análise de mudanças mais drásticas. Na realidade, esta é uma limitação em muitos métodos de análise diferencial de genes. Dado o vasto número de genes mudando em expressão nas variadas condições testadas, é comum utilizar somente os que mudam mais significativamente, muito embora mudanças sutis na expressão de alguns genes podem levar a efeitos significativos na expressão de outros genes.

Foram encontrados 126 genes desregulados (com relação a expressão esperada na GRN da pele) nas amostras controle de queratinócitos cultivados em culturas organotípicas (Control STAU e Control TINCR), Figura 19(A,B) com 64 genes compartilhados entre ambos os controles. Utilizando *gene set enrichment analysis*, as categorias funcionais em Processos Biológicos na Ontologia de Genes a que pertencem estes 64 genes foram determinadas e constatou-se que os genes sub-expressos estão diretamente relacionados com vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da pele enquanto que genes super-expressos parecem estar associados a algum tipo de processo patológico, Figura 19(C).

Uma análise similar foi realizada para as células LCM, "sorted KC" e NHEK, encontrando mais de 500 genes diferencialmente expressos, 119 dos quais são compartilhados entre "sorted KC" e NHEK, Figura 19(D,F). A pequena sobreposição entre genes diferencialmente expressos entre LCM, "sorted KC" e NHEK sugere que LCMs são significativamente distintas de células do tipo "sorted KC" e NHEK, em nível de transcriptoma.

As categoriais funcionais as quais estes genes pertencem constam na Figura 19(G) e não é muito claro como estes processos poderiam ser explicados. A sobreposição de genes diferencialmente expressos em culturas organóides, LCM, sorted KC e NHEK consiste de somente 3 genes, Figura 19(E). Isto sugere a existência de diferenças significativas no transcriptoma de células em diferentes condições de cultura celular, lembrando que, com exceção das LCMs, todos os outros tipos de células nesta análise são queratinócitos.

Figura 19: Análise de genes desregulados em queratinócitos com relação ao conjunto de treinamento da GRN da pele (CellNet). (A) Genes desregulados nas amostras controle de queratinócitos cultivados em culturas organóides (STAU1, TINCR). (B) Genes sub- e super-expressos. (C) Categorias funcionais as quais estes genes pertencem quando células são cultivadas em culturas organóides. (D) Genes desregulados em LCM, "sorted KC" e NHEK. (E) Genes diferencialmente expressos em culturas organóides, LCM, "sorted KC" e NHEK. (F) Genes desregulados em ambas as amostras de células "sorted KC" e NHEK. Categorias funcionais dos genes desregulados em "sorted KC" e NHEK.



Portanto, é possível concluir que condições microambientais influenciam substancialmente o transcriptoma de células em culturas 2D e 3D e que, quando comparadas a GRN da pele "padrão", vias de sinalização essenciais para o desenvolvimento da pele não são apropriadamente ativadas. Esta análise sugere uma abordagem racional para desenvolver biomateriais que recapitulam condições microambientais fisiologicamente relevantes e que poderiam levar ao desenvolvimento de modelos pré-clínicos para testes de novos fármacos com maiores chances de sucesso.

Infelizmente, não existem muitos dados de expressão de genes publicamente disponíveis em que biomateriais foram utilizados como plataforma de cultura celular, limitando assim quaisquer possíveis generalizações destas análises. O mesmo se aplica para as análises nanopartícula-célula descritas neste capítulo. Porém, estes dados corroboram com os dados disponíveis na literatura e a plataforma computacional desenvolvida (CellNet) fornece

as ferramentas analíticas necessárias para possivelmente elucidar pelo menos alguns dos mecanismos subjacentes às interações nanopartícula-célula e biomaterial-célula.



## 6 DESIGN DE NANOPARTÍCULAS BASEADO EM ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA

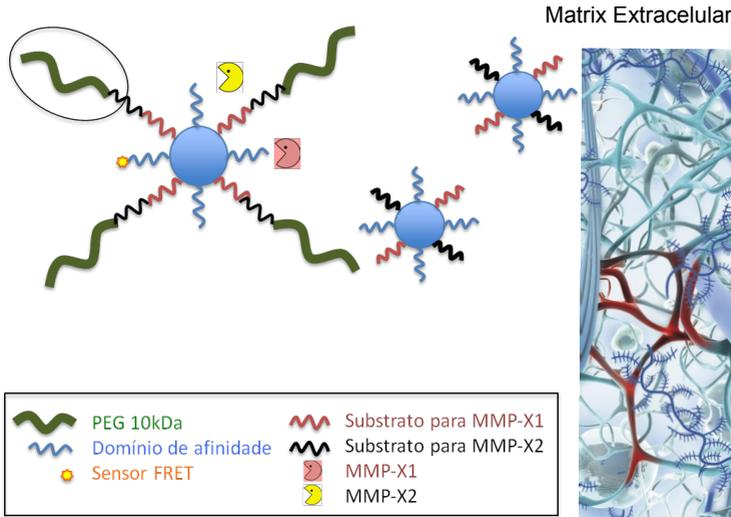
A habilidade de mais especificamente distribuir agentes terapêuticos com capacidades tecido-seletivas pode superar muitos obstáculos no tratamento de doenças (PEER et al., 2007) e em medicina regenerativa (DVIR et al., 2011b). Em câncer, a despeito de modificações microambientais e incontáveis redes biomoleculares intra e extracelulares envolvidas durante o desenvolvimento da doença, as estratégias terapêuticas atuais baseiam-se principalmente no paradigma de um único biomarcador para especificamente distinguir um tecido saudável de um patológico (RUOSLAHTI; BHATIA; SAILOR, 2010).

Intracelularmente, vias biomoleculares sintéticas têm sido exploradas possibilitando respostas terapêuticas por meio do monitoramento de múltiplos biomarcadores "câncer-específicos", parcialmente restringindo a ação terapêutica a células tumorais (LEISNER et al., 2010). Além disso, avanços em biologia sintética têm demonstrado processamento de informação com múltiplas entradas em células vivas (XIE et al., 2011). Porém, estas abordagens requerem a distribuição eficiente destes sistemas sintéticos para as células do microambiente tumoral. A visão centralizada na célula sobre o desenvolvimento de câncer está mudando à medida que o entendimento das interações célula-microambiente aumenta, sugerindo que a matriz extracelular e células estromais são componentes cruciais contribuindo para as características do câncer. Dada a complexidade do microambiente tumoral, um *targeting* efetivo por meio de um domínio molecular de alta afinidade não têm correspondido às expectativas iniciais.

Para melhor definir um contexto associado à doença para nanopartículas ativáveis, múltiplos biomarcadores deveriam ser monitorados simultaneamente, para mais precisamente controlar o acúmulo de nanopartículas no tumor. No entanto, extracelularmente, os processos biológicos que poderiam ser explorados não são claros tão pouco definidos, quando comparados a processos intracelulares, tais como recombinação de DNA quando ocorre a quebra da dupla hélice. Portanto, procurou-se por elementos em vias biomoleculares associados à remodelagem anormal da matriz extracelular, processo este virtualmente associado a quase todos os tipos de tumores sólidos. A habilidade de enzimas tais como proteases atuar em vias proteolíticas clivando substratos moleculares e seus papéis importantes na progressão de câncer e metástase tornam estas proteases bastante atrativas para idealizar nanopartículas com capacidades de sensoriamento, computação e atuação.

Nestes sistemas, sensores são compostos por substratos peptídicos que,

Figura 20: Esquema idealizado da nanopartícula sintetizada. Neste sistema, metaloproteinasas clivam substratos peptídicos modificados com PEG 10 kDa, hipoteticamente expondo peptídeos de alta afinidade com a matrix extracelular.



sob clivagem, poderiam desempenhar as operações lógicas "E" e "OU", e então atuar produzindo como resultado o acúmulo seletivo de nanopartículas no tumor. Enzimas de diferentes classes foram consideradas, incluindo metaloproteinasas da matrix, cisteína catepsinas e serina proteases. Substratos para estas classes de enzimas foram conjugados nas superfícies das nanopartículas buscando desenvolver nanomateriais ativados por processos de remodelagem anormal da matrix extracelular, conforme esquematicamente ilustrado na Figura 20.

## 6.1 METODOLOGIA COMPUTACIONAL E EXPERIMENTAL

### 6.1.1 Abordagem computacional

A metodologia computacional utilizada neste capítulo é essencialmente a mesma utilizada nos capítulos anteriores. Perfis de expressão de genes para tumores de pele, fígado e colorretal foram obtidos da base de dados GEO e foram então analisados de acordo com o *pipeline* para análise tal como imple-

mentado na plataforma CellNet. Genes foram considerados diferencialmente expressos comparando a expressão dos genes nas amostras tumorais com a distribuição de expressão dos genes em cada GRN célula e tecido-específica reconstruída por CellNet. Genes com z-scores maiores que três, ou seja, que desviaram substancialmente dos valores esperados (dados de treinamento da plataforma CellNet) foram considerados desregulados.

### 6.1.2 Síntese das nanoestruturas ativadas por proteases

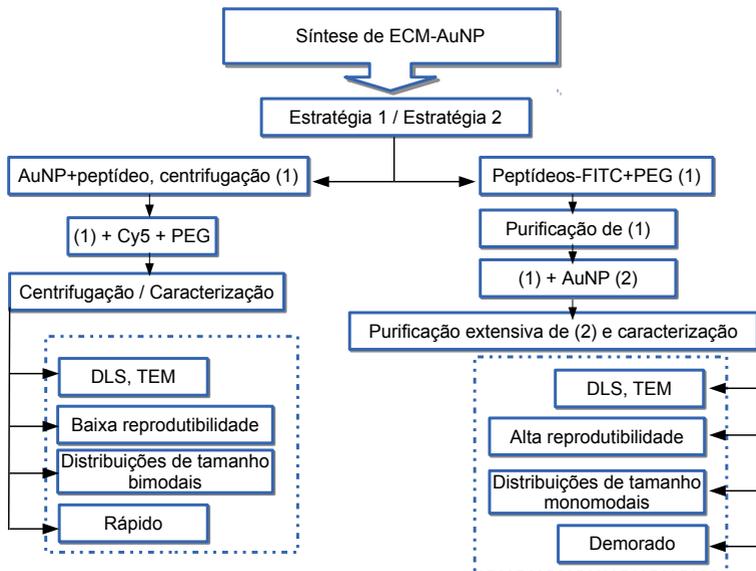
Para a síntese de AuNP, uma placa de aquecimento foi primeiramente aquecida à 400 °C durante 10 minutos. Então, 500  $\mu$ L de uma solução 50 mM de HAuCl<sub>4</sub> foram adicionados a 100 mL de água deionizada. Após fervura vigorosa, 3 mL de uma solução de citrato de sódio 1% foram rapidamente adicionados sob agitação vigorosa. Após observar as mudanças de coloração típicas (de transparente para vermelho), a solução foi removida do calor e resfriada a temperatura ambiente.

Todas as conjugações de peptídeos na superfície das AuNPs apresentadas neste capítulo são baseadas na química ouro-tiól, onde átomos de enxofre(tiól) apresentam alta afinidade com átomos de ouro, gerando recobrimentos de superfície estáveis. Para a síntese de AuNP-ECM (AuNP que respondem a sinais da matrix extracelular, ECM), essencialmente duas estratégias de síntese foram elaboradas, como apresentado na Figura 21. A primeira consistiu de utilizar peptídeos não rotulados (sem FITC) e primeiramente conjugar os peptídeos nas superfícies das AuNP utilizando a química ouro-tiól. Tentativas para conjugar o fluoróforo Cy5 e os polímeros PEG nos peptídeos já na superfície das AuNP foram realizadas (síntese sequencial). Esta estratégia foi primeiramente testada por ser mais rápida e exigir menos passos de purificação além de possibilitar a visualização *in vivo* da atividade das proteases de interesse dado que o fluoróforo Cy5 opera na região do infra-vermelho próximo.

Uma segunda estratégia foi então elaborada, que apresentou melhores resultados porém exigia passos adicionais, principalmente de purificação. Purificação das AuNP-ECM se mostrou realmente difícil durante o decorrer do trabalho e mesmo após meses buscando melhores métodos, condições ótimas não puderam ser obtidas. A estratégia utilizada é descrita como segue:

Peptídeos foram sintetizados pelo serviço de síntese de peptídeos da Tufts University. Substratos peptídicos rotulados com FITC foram projetados para conter um grupo NH<sub>2</sub> terminal, para conjugação a polímeros PEG, uma sequência de clivagem por protease e uma cisteína terminal para conjugação na superfície das AuNPs. Peptídeos foram reagidos com mPEG-NHS amino-

Figura 21: Fluxograma das estratégias de síntese de nanopartículas utilizadas.



reativos em PBS + 0,005 M EDTA, pH 7,4, em concentrações de 3,9 mM e 2,5 mM, respectivamente, por uma hora sob agitação e em temperatura ambiente. Em geral, uma razão molar de aproximadamente 2:1 peptídeo-PEG foi mantida. Peptídeos não reagidos foram removidos reduzindo com 0,2 M TCEP por uma hora. Conjugados peptídeo-PEG foram purificados cinco vezes utilizando centrifugação por exclusão de tamanho com tubos Vivaspin com corte para peso molecular inferior a 5 kDa. Desde que os peptídeos apresentam peso molecular em torno de 1,5 kDa e os polímeros PEG em torno de 10 kDa, somente os peptídeos deveriam passar pelo filtro, purificando o produto peptídeo-PEG. A concentração dos produtos peptídeo-PEG foi quantificada utilizando a equação de Beer-Lambert:

$$A = e * c * l \quad (6.1)$$

onde  $A$  é a absorvância,  $e$  é o coeficiente de extinção para FITC ( $68000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c$  é a concentração e  $l$  é o comprimento, 1 mm para o Nanodrop utilizado.

Então, conjugados peptídeo-PEG e AuNP foram misturados utilizando uma razão molar de 2500:1, respectivamente, a temperatura ambiente por

uma hora, criando nanopartículas ativáveis por processos de remodelagem anormal da matriz extracelular. Estas nanopartículas foram dializadas (utilizando uma membrana com corte para peso molecular 100 kDa) por dois dias, trocando a água a cada duas horas. O objetivo desta etapa de purificação foi remover conjugados peptídeo-PEG que não reagiram com a nanopartícula. Então, nanopartículas foram centrifugadas a 15000 xg por 25 minutos e dispersas em PBS para estudos posteriores.

### 6.1.3 Caracterização

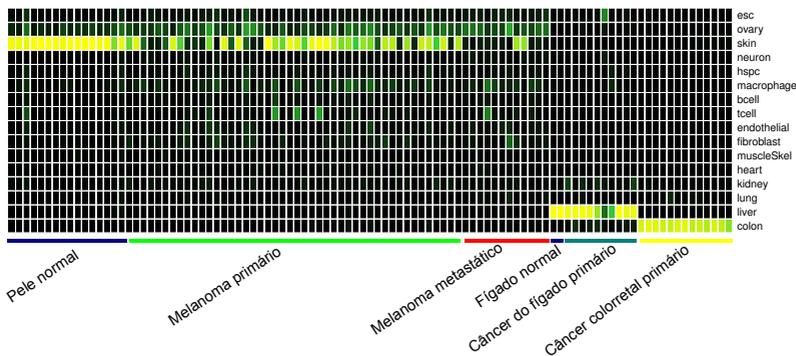
Nanopartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão utilizando o instrumento JEOL JEM-1400 (resolução: 0,2 nm linha, 0,38 nm ponto) operando a 120 kV. Brevemente, grids para TEM foram tratados com plasma durante um minuto e então uma gota da amostra foi depositada sobre uma membrana de carbono suportada por um grid de cobre. Permitiu-se que a amostra seca-se a temperatura ambiente por um minuto antes da observação. Caracterização de distribuição de tamanho foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o instrumento Malvern NanoZS zetasizer. Cubetas descartáveis (volume de amostra 50  $\mu$ L) foram utilizadas para as caracterizações por DLS. Medidas de fluorescência foram realizadas em placas de 96 poços utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão para o fluoroforo FITC (488 e 520 nm, respectivamente), a 37°C no equipamento SpectroMax Gemini EM. Medidas de concentração de conjugados peptídeo-PEG foram realizadas utilizando o equipamento Nanodrop, realizando a leitura de absorbância para FITC em 495 nm, em PBS e pH 7,4. Concentrações típicas dos produtos peptídeo-PEG após purificação eram em torno de 600-900  $\mu$ M em volumes de 50 a 100  $\mu$ L.

## 6.2 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES IMPORTANTES EM 3 DIFERENTES TIPOS DE CANCER

Dados de expressão de genes para três diferentes tipos de câncer foram analisados para verificar padrões de super-expressão de genes envolvidos na remodelagem anormal da matriz extracelular. Para melanoma e câncer do fígado, amostras de tecidos normais estavam disponíveis. Primeiramente, escores de classificação para melanoma, câncer do fígado e câncer colorretal foram calculados e são apresentados na Figura 22. Nesta figura, cada linha representa um tipo de célula ou tecido para o qual CellNet foi apropriadamente desenvolvido para analisar e as colunas representam amostras de tumores pri-

mários e metastáticos de pacientes. Como esperado, CellNet foi capaz de determinar o tecido de origem destes tipos de câncer embora alguma variabilidade esteja presente para melanoma e câncer do fígado. Melanoma parece apresentar alta variabilidade em seus programas de expressão de genes visto que muitas amostras de tecidos tumorais primários e metastáticos possuem escores de classificação bastante baixos, sugerindo transformação neoplásica substancial nestas amostras.

Figura 22: Heatmap de classificação para três tipos diferentes de câncer, melanoma, câncer no fígado e câncer colorretal.



Genes envolvidos em remodelagem da matriz extracelular apresentando mudanças de expressão nestes diferentes tipos de câncer foram determinados, comparando-se a distribuição da expressão destes genes no conjunto de treinamento utilizado por CellNet durante a etapa de reconstrução de GRNs com a expressão dos genes nas amostras tumorais. CellNet possibilitou a determinação de genes desregulados em cada amostra tecidual avaliada; portanto, dada a variabilidade associada a cada câncer, alguns genes são considerados super-expressos em algumas amostras e sub-expressos em outras, Tabela 1.

Particularmente, os genes MMP2, MMP9, CTSB e PLAU foram escolhidos principalmente devido à existência de sequências peptídicas disponíveis na literatura, que atuam como substratos para os seus produtos protéicos assim como sua importância durante a progressão tumoral. Um aspecto importante deste capítulo é a integração de abordagens computacionais e experimentais para desenvolver nanoestruturas, cuja química de superfície poderia ser projetada de acordo com particularidades específicas de cada tipo de câncer analisado.

A hipótese deste capítulo é que a remoção completa da camada polimérica protetora somente acontecerá quando duas ou mais proteases são super-expressas no microambiente tumoral, expondo um peptídeo de alta afinidade com a matriz celular, promovendo, então o acúmulo específico de nanomateriais no tumor. A super-expressão de somente uma protease dificultaria a remoção completa da camada polimérica de proteção e as nanopartículas permaneceriam na circulação sanguínea até serem eliminadas do organismo ou até finalmente se acumularem no tumor.

Portanto, uma parte crítica da proposta deste capítulo é a seletividade das proteases de interesse com relação aos respectivos substratos, que logo mostrou-se não eficaz, conforme explicado nas próximas seções. A melhor estratégia para encontrar peptídeos substrato-específicos para cada protease seria desenvolver uma biblioteca de peptídeos, provavelmente contendo mais de 50 sequências, e então avaliar a seletividade de cada protease com relação a esta biblioteca e também com relação a nanopartícula de interesse.

1. NH<sub>2</sub>-Gly-Lys-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Cys-COOH, para MMP2 e MMP9
2. NH<sub>2</sub>-Gly-Lys-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Cys-COOH, para MMP2 e MMP9
3. NH<sub>2</sub>-Gly-Lys-Gly-Gly-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-COOH, para Cathepsina B (CTSB)
4. NH<sub>2</sub>-Gly-Lys-Gly-Gly-Ser-Gly-Arg-Ser-Ala-Asn-Ala-Cys-COOH, para uPA (PLAU).

Nanopartículas de ouro (AuNP) foram utilizadas como nanopartículas modelo. Neste caso, peptídeos foram projetados para conter, sequencialmente, um grupo terminal NH<sub>2</sub>, para conjugar os peptídeos aos polímeros PEG, uma sequência de aminoácidos substrato para as enzimas de interesse, e o aminoácido cisteína(Cys), para conjugação dos peptídeos na superfície das nanopartículas de ouro, esquematicamente, PEG-NH<sub>2</sub>-SUBSTRATO-Cys-AuNP.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada novo batch de AuNP e AuNP-ECM, medidas de DLS foram realizadas para garantir que os experimentos posteriores fossem realizados utilizando nanopartículas uniformes e com as distribuições de tamanho esperadas. Tipicamente, AuNP apresentam um tamanho de 20 nm. Após conjugar as moléculas peptídeo-PEG na superfície das AuNP, tamanhos típicos obtidos

Tabela 1: Genes codificadores de proteases desreguladas em melanoma, câncer do fígado e câncer colorretal.

Tipos de câncer	Super-expresso	Sub-expresso
Melanoma	MMP1, MMP9, MMP16 TIMP1, TIMP2, CTSB, CTSF, CTSL, CTSO, CTSZ, PLAUR, CTSC, CTSS, CTSW, MMP8, MMP14, PLAU, MMP3, TIMP4, MMP13	MMP7, MMP8, MMP13, TIMP4, PLAU, MMP15, CTSF, MMP16, CTSW
Fígado	MMP15, MMP16, PLAU, MMP2, MMP3, MMP13, TIMP4, CTSC, MMP1, MMP9, CTSF, PLAUR, MMP14,CTSB	TIMP2, CTSB, CTSL, CTSS, CTSO, TIMP3, CTSC, TIMP1, CTSF
Colorectal	MMP7, MMP13, MMP1, MMP3, MMP2, MMP16, TIMP4, TIMP1, PLAUR	TIMP1, TIMP2, TIMP3, CTSC, CTSK, CTSO, CTSL, CTSB, MMP1

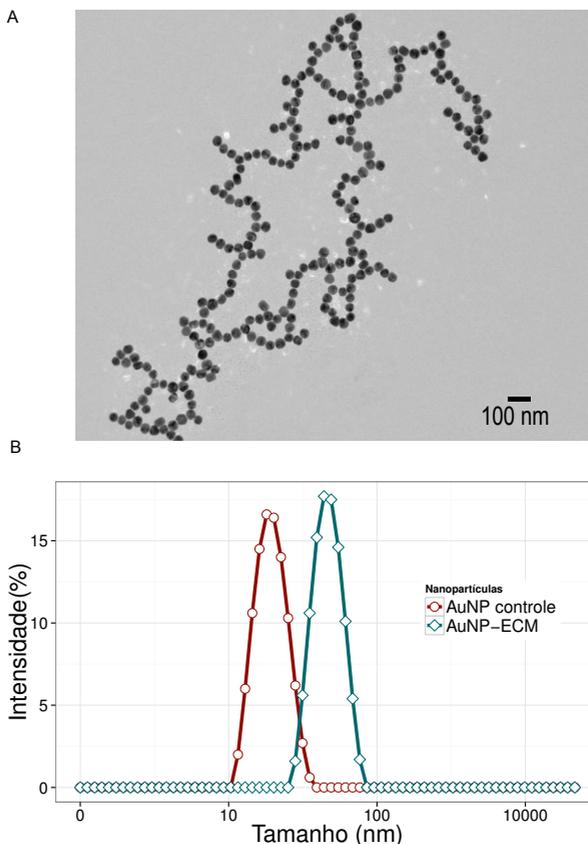
encontram-se em torno de 55 nm, consistente com modificações de superfície utilizando somente polímeros PEG com peso molecular de 10 kDa, Figura 23. Portanto, uma vez obtidas AuNP-ECM com alto rendimento e reprodutibilidade, os experimentos para verificar se as proteases são capazes de penetrar a camada polimérica de PEG e clivar os peptídeos nas AuNP-ECM foram realizados.

#### 6.4 FRET PARA DETERMINAR A CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS

Buscando caracterizar a especificidade de cada enzima para os seus respectivos substratos, experimentos baseados em *Foster Resonance Energy Transfer* (FRET) foram realizados, em que nanopartículas de ouro inibem o sinal fluorescente proveniente dos fluoróforos conjugados aos peptídeos. Após clivagem pelas enzimas, os peptídeos são liberados da superfície das AuNP-ECM e a fluorescência dos fluoróforos foi registrada utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax).

A Figura 24 apresenta os resultados de dois experimentos de especificidade realizados. Na Figura 24(A), AuNP-ECM modificadas com substratos para a enzima MMP9 foram incubadas com as enzimas MMP9 e uPA e o

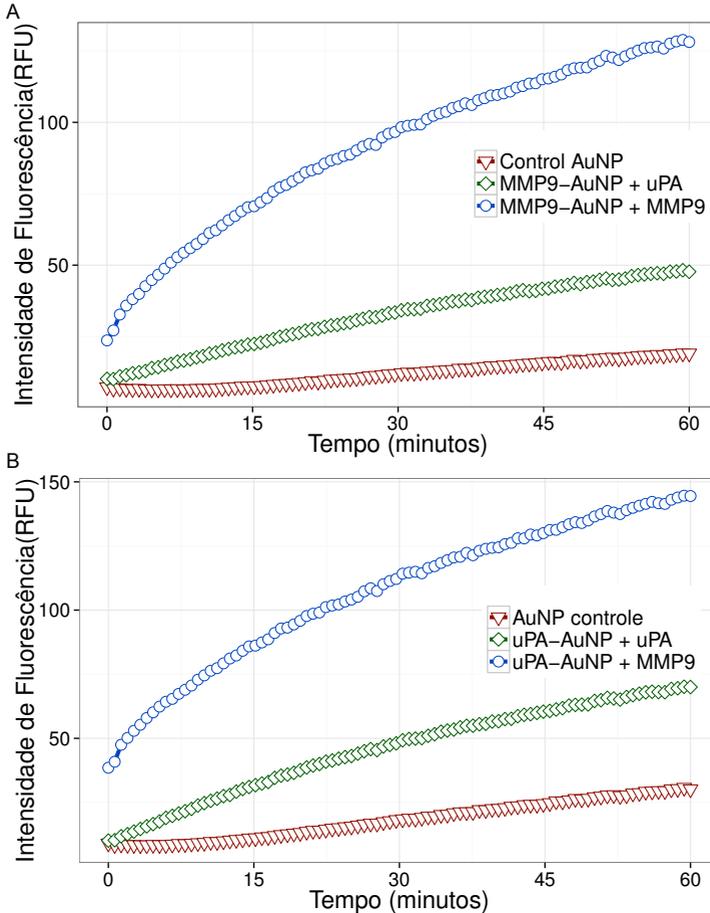
Figura 23: Caracterização de AuNP e AuNP-ECM. (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de AuNP antes da modificação de superfícies. (B) Medidas de distribuição de tamanho para nanopartículas antes da modificação de superfícies (AuNP) e após conjugação das moléculas peptídeo-PEG, tal como medido por DLS.



aumento na intensidade de fluorescência foi monitorado com o tempo. Como esperado, a enzima MMP9 é capaz de clivar seu substrato mais eficientemente do que a enzima uPA. No entanto, quando AuNP-ECM foram modificados com os substratos peptídicos para uPA, a enzima MMP9 foi mais eficiente do que a enzima uPA, Figura24(B).

Experimentos semelhantes foram realizados para avaliar todas as combinações de substratos e enzimas possíveis, chegando-se a conclusão que os substratos não são seletivos e que as enzimas MMP9/MMP2 são capazes de

Figura 24: Caracterização da seletividade das enzimas com relação aos seus substratos. (A) AuNP-ECM, funcionalizadas com substratos para MMP9 e incubadas com as enzimas MMP9 e uPA por uma hora. (B) AuNP-ECM, funcionalizadas com substratos para a enzima uPA e incubadas com as enzimas MMP9 e uPA.



clivar eficientemente todos os substratos utilizados. Como pode ser observado, a intensidade de fluorescência das AuNP-ECM controle (AuNPs modificadas com os peptídeos mas sem a incubação com as enzimas), também aumentou com o tempo. Durante os primeiros experimentos, esse aumento foi ainda mais significativo e não era possível distinguir o aumento de fluorescência dos controles daqueles observados pela ação das enzimas. Este problema

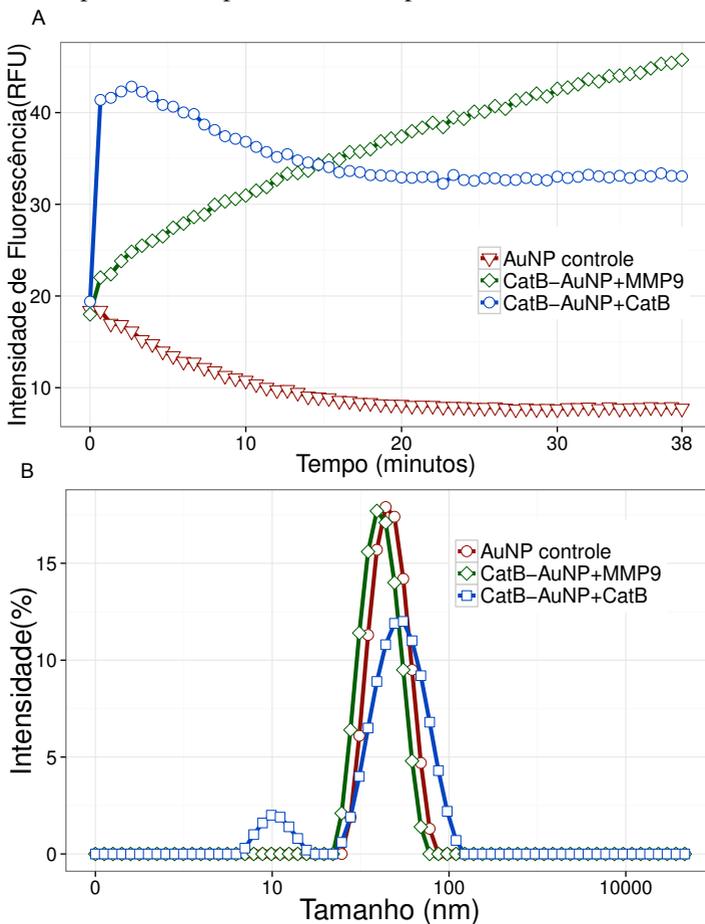
levou bastante tempo para ser razoavelmente compreendido e contornado de forma que os dados na Figura 24 pudessem ser obtidos.

Este aumento de fluorescência dos controles foi intrigante e uma hipótese plausível seria que conjugados peptídeo-PEG não reagidos com as AuNP ficaram aderidos à monocamada formada por peptídeo-PEG que reagiram e com o tempo eram "liberados" da superfície das AuNP. Diversos métodos de purificação foram testados como centrifugação convencional, centrifugação utilizando tubos contendo filtros para pesos moleculares específicos, diferentes membranas e aparatos de diálise e diferentes tempos de diálise (de 1-7 dias). A melhor solução encontrada foi dialisar as AuNP-ECM e monitorar a fluorescência destas nanopartículas sem incubá-las com as enzimas. Quando o aumento de fluorescência não era mais significativo, a purificação era interrompida e os próximos experimentos realizados. Tipicamente, este processo foi realizado por três dias trocando a água a cada duas horas, e o aumento de fluorescência dos controles foi tipicamente aquele observado na Figura 24 (A,B), demonstrando claramente que as enzimas são capazes de difundir pela camada polimérica, clivar os substratos liberando a parte do peptídeo contendo FITC da nanopartícula e possibilitando a detecção da clivagem dos substratos monitorando, a intensidade de fluorescência da suspensão de AuNP-ECM. Estes experimentos também foram realizados para a enzima catepsina B e os resultados foram bastante intrigantes, conforme descrito na próxima seção.

## 6.5 AUNP-ECM MODIFICADAS COM SUBSTRATOS PARA CATEPSINA B

Na Figura 25, AuNPs foram modificadas com substratos para a enzima catepsina B e então incubadas com MMP9 e catepsina B. Inicialmente, um aumento significativo na intensidade de fluorescência foi observado para AuNP-ECM incubadas com a catepsina B, indicando seletividade da enzima com relação ao seu substrato quando comparada a MMP9, Figura 25(A). No entanto, após alguns minutos, a intensidade de fluorescência permanece essencialmente inalterada. Por outro lado, a intensidade de fluorescência para as AuNP-ECM incubadas com MMP9 aumenta durante o decorrer do experimento, Figura 25(A). Isto levou a hipótese que AuNP poderiam inibir a atividade enzimática da enzima catepsina B. Então, uma busca na literatura revelou que catepsinas, quando ativas, possuem grupos tiól (S) livres em sua estrutura e, portanto, as enzimas poderiam estar sendo conjugadas na superfície das AuNPs, uma vez que a química de bioconjugação dos peptídeos e das enzimas nas AuNPs é a mesma, isto é, a química ouro-tiól. Como um

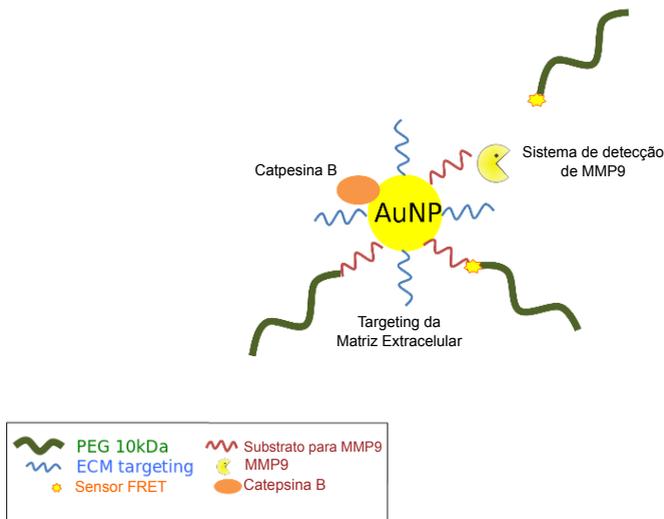
Figura 25: Catepsinas parecem ser conjugadas nas AuNP-ECM ao invés de clivar seus substratos. (A) Medidas de fluorescência monitorando a clivagem de peptídeos substratos para catepsina B por MMP9 e catepsina B. (B) Variação do tamanho da nanopartícula, sugerindo a adoração ou conjugação da enzima catepsina B na superfície das nanopartículas.



experimento preliminar, AuNPs modificadas com o substrato peptídico para catepsina B foram incubadas com MMP9 e catepsina B nas mesmas condições dos experimentos anteriores, Figura 25.

Medidas de distribuição de tamanho por DLS mostram que incubação com MMP9 resultou em redução de tamanho das AuNP-ECM (47,4 nm), Figura 25(B), devido a remoção parcial da monocamada peptídeo-PEG com-

Figura 26: Esquema de uma abordagem terapêutica baseada na ativação da nanopartícula por metaloproteínas da matriz (MMP9 e MMP2) e inibição da atividade da catepsina B no microambiente tumoral como um tratamento para câncer.



parada com as AuNPs controle (56,5 nm) e, como esperado, AuNP-ECM incubadas com a enzima catepsina B aumentaram de tamanho (68,6nm), consistente com a hipótese que as enzimas estão adsorvendo ou sendo conjugadas nas superfícies das AuNP-ECM, Figura 25(B). Consistentemente, algumas fármacos que inibem a atividade de catepsinas geralmente incluem átomos de ouro em sua composição e tem sido usadas no tratamento de artrite reumatóide. Se esta função inibidora pode ser explorada para o tratamento de câncer ainda precisa ser demonstrado. Isto levou a reformulação da proposta original, Figura 20, para um sistema de nanopartículas ativado por MMP9/2 cuja função terapêutica está intrinsecamente associada à nanopartícula. Tal nanopartícula é esquematicamente apresentada na Figura 26. Desta forma, os dados apresentados nesta seção sugerem uma abordagem terapêutica onde super-expressão de MMP9 e/ou MMP2 remove a camada polimérica protetora exibindo peptídeos com alta afinidade de ligação à ECM e possibilitando a inibição da atividade de catepsinas B aberrantemente expressas no microambiente tumoral.



## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho indicam, sob diferentes perspectivas, que interações nanopartícula-célula e biomaterial-célula podem afetar as propriedades estruturais das membranas celulares assim como elicitar mudanças globais em programas de expressão de genes. A partir das análises realizadas por meio da plataforma CellNet, foi possível constatar que nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos EGFP podem induzir respostas inflamatórias em células PBMCs e que, mesmo em culturas de células organotípicas, vias sinalização associadas ao desenvolvimento da pele não são apropriadamente ativadas. Ao mesmo tempo, mostrou-se que o microambiente tecidual contribui para um maior estabelecimento da GRN do tecido cardíaco assim como as propriedades funcionais dos cardiomiócitos convertidos. No que se refere a síntese de nanopartículas, os resultados apresentados sugerem que nanopartículas de ouro podem inibir a atividade da enzima catepsina B, que é super-expressa em muitos tipos de câncer.

1. Simulações de dinâmica molecular sugerem que o projeto adequado de química de superfície de nanopartículas pode favorecer diferentes vias de internalização celular tais como translocação passiva e reorganizações de membrana similares aquelas encontradas nos primeiros estágios da endocitose. Nanopartículas com baixas densidade de carga positiva e ligantes relativamente pequenos favorecem translocação passiva através de modelos de membrana celular. Altas densidades de carga sugerem "envolvimento" da nanopartícula pela membrana.
2. CellNet forneceu novos "insights" na engenharia de identidade celular onde reprogramação de células somáticas para um estado de pluripotência induzida mostrou-se o paradigma de engenharia celular mais proeminente. Cardiomiócitos derivados por diferenciação dirigida de células-tronco pluripotentes estabelecem mais completamente suas GRNs célula- e tecido-específicas do que cardiomiócitos diretamente convertidos a partir de fibroblastos. Embora cardiomiócitos derivados de células-tronco (diferenciação dirigida) sejam superiores a cardiomiócitos diretamente convertidos, estas células ainda assim não estabelecem completamente a GRN do coração. A falta de estabelecimento completo da GRN do coração em cardiomiócitos derivados por diferenciação dirigida parece estar associada à inacessibilidade aos promotores dos genes governando a identidade do tecido cardíaco, sugerindo que programas desenvolvimentais da diferenciação *in vitro* falham em ativar apropriadamente os programas de expressão de genes essenciais

para cardiomiócitos. Já para conversão direta (fibroblastos para cardiomiócitos), a maior barreira comprometendo a qualidade da população final de células não parece ser acessibilidade aos promotores de genes essenciais mas sim a falha em apropriadamente silenciar a GRN da população inicial de células (fibroblastos, neste caso). Além disso, análises utilizando CellNet mostraram que o microambiente do coração de camundongos forneceu sinais indutivos/seletivos que levam a melhoras nas propriedades funcionais das células derivadas *in situ*.

3. Interações nanopartícula-célula induzem expressão diferencial de genes associados a respostas inflamatórias em células PBMCs interagindo com nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos EGFP. Células PBMCs incubadas com oligonucleotídeos EGFP não apresentaram mudanças evidentes no estabelecimento da GRN de macrófagos, células T e B. Porém, uma alteração significativa no nível de estabelecimento da GRN de macrófagos para células incubadas por 24 e 48h com nanopartículas de ouro modificadas com oligonucleotídeos EGFP foi observada. Estes resultados sugerem que a nanopartícula ou efeitos sinérgicos entre a nanopartícula e oligonucleotídeo, são responsáveis pela ativação de respostas inflamatórias. Respostas imune adaptativas parecem ser inibidas, mas não é possível afirmar baseado somente na análise realizada.
4. Culturas de células organóides favorecem o estabelecimento mais completo de GRNs governando a "identidade" da pele e parecem realmente recapitular programas de expressão de genes da pele humana *in vivo*. Ainda assim, falham em ativar vias de sinalização essenciais para o desenvolvimento da pele.
5. Nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas. A química de superfície foi projetada baseada em análises do transcriptoma de diferentes tipos de câncer. Genes envolvidos em remodelagem anormal da matriz extracelular são super-expressos nos três diferentes tipos de câncer analisados. Sequências peptídicas para os produtos protéicos destes genes (MMP2, MMP9 e Catepsina B) foram conjugadas a polímeros PEG e então conjugados na superfície das nanopartículas para criar nanopartículas ativadas por processos de remodelagem anormal da matriz extracelular. Proteases foram capazes de clivar os peptídeos e remover a camada polimérica protetora, sugerindo que a ativação destas nanopartículas em tecidos tumorais que apresentam super-expressão destes genes é plausível. Nanopartículas de ouro parecem inibir a atividade da enzima catepsina B. Porém, se a inibição da catepsina B por nanopartículas de ouro poderia ser utilizada como modalidade de tratamento em

câncer ainda precisa ser demonstrado. Validação da ação terapêutica em células e animais deverão ser conduzidas para a obtenção de resultados definitivos sobre esta parte do trabalho.



## 8 PUBLICAÇÕES

### 8.1 EM REVISTAS

1. Cahan, Patrick.\* ; Li, Hu\* ; Morris, Samantha\* ; **Rocha, Edroaldo Lummertz da** ; Daley, G. Q. ; Collins, J. J. . CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering. \*Estes autores contribuíram igualmente. Cell (Cambridge), v. 158, p. 903-915, 2014. Artigo de Capa da revista Cell.
2. **ROCHA, E.**; PORTO, L.; RAMBO, C. Nanotechnology meets 3d in vitro models: Tissue engineered tumors and cancer therapies. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, n. 0, p. 270-279, jan. 2014. ISSN 0928-4931.
3. **ROCHA, E. L. d.**; CARAMORI, G. F.; RAMBO, C. R. Nanoparticle translocation through a lipid bilayer tuned by surface chemistry. **Phys.Chem. Chem. Phys.**, The Royal Society of Chemistry, v. 15, n. 7, p.2282-2290, 2013. ISSN 1463-9076. (Capa da revista PCCP)

### 8.2 EM CONGRESSOS

1. ROCHA, E. L. ; BERTI, F. V. ; PORTO, L. M. ; RAMBO, C. R. . Photodynamic therapy of melanoma cancer using ZnO nanostructures. In: XI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2012, Florianópolis. XI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2012.
2. ROCHA, E. L. ; CARAMORI, G. F. ; PORTO, L. M. ; RAMBO, C. R. . Interaction between gold nanoparticles and biomembranes investigated by coarse-grained molecular dynamics simulation. In: X Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2011, Gramado. X Encontro da SBPMat, 2011.



## REFERÊNCIAS

AASEN, T. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. **Nat Biotech**, Nature Publishing Group, v. 26, n. 11, p. 1276–1284, nov. 2008. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1503>>.

AINALEM, M.-L. et al. On the ability of pamam dendrimers and dendrimer/dna aggregates to penetrate popc model biomembranes. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 114, n. 21, p. 7229–7244, maio 2010. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp9119809>>.

ALI, O. A. et al. Infection-mimicking materials to program dendritic cells in situ. **Nat Mater**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 2, p. 151–158, fev. 2009. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2357>>.

BALASUBRAMANIAN, S. K. et al. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2034 – 2042, 2010. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209013234>>.

BEDROV, D. et al. Passive transport of c60 fullerenes through a lipid membrane: A molecular dynamics simulation study. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 112, n. 7, p. 2078–2084, jan. 2008. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp075149c>>.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys.**, AIP, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, out. 1984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.448118>>.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature Rev. Cancer**, Nature Publishing Group, v. 1, n. 1, p. 46–54, out. 2001. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35094059>>.

CAHAN, P. et al. Cellnet: Network biology applied to stem cell engineering. **Cell**, Elsevier, v. 158, n. 4, p. 903–915. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(14\)00934-9](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(14)00934-9)>.

CAO, Y.; LANGER, R. Optimizing the delivery of cancer drugs that block angiogenesis. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 15, p. 15ps3, 2010. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/content/2/15/15ps3.abstract>>.

CHAN, H.; KRAL, P. Self-standing nanoparticle membranes and capsules. **Nanoscale**, The Royal Society of Chemistry, v. 3, n. 4, p. 1881–1886, 2011. ISSN 2040-3364. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C0NR00912A>>.

CHEN, J. et al. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. **Small**, WILEY-VCH Verlag, v. 6, n. 7, p. 811–817, 2010. ISSN 1613-6829. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/sml.200902216>>.

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Lett.**, American Chemical Society, v. 6, n. 4, p. 662–668, mar. 2006. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nl052396o>>.

CHIU, I. M. et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. **Nature**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 501, n. 7465, p. 52–57, set. 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12479>>.

CHO, E. C. et al. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a i2/ki etchant. **Nano Lett.**, American Chemical Society, v. 9, n. 3, p. 1080–1084, fev. 2009. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nl803487r>>.

CHO, E. C.; ZHANG, Q.; XIA, Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 6, p. 385–391, jun. 2011. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.58>>.

CHRISTOFOROU, N. et al. Mouse es cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. **J Clin Invest**, The American Society for Clinical Investigation, v. 118, n. 3, p. 894–903, mar. 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/33942>>.

DAVIDSON, E. H.; ERWIN, D. H. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 796–800, fev. 2006.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature Rev. Drug Discov.**, Nature

Publishing Group, v. 7, n. 9, p. 771–782, set. 2008. ISSN 1474-1776.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2614>>.

DAVIS, R. L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. **Cell**, Elsevier, v. 51, n. 6, p. 987–1000, 1987. Disponível em:  
<[http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674\(87\)90585-X](http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(87)90585-X)>.

DAW, M. S.; BASKES, M. I. Embedded-atom method: Derivation and application to impurities, surfaces, and other defects in metals. **Phys. Rev. B**, American Physical Society, v. 29, n. 12, p. 6443–6453, jun. 1984.  
Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.29.6443>>.

DERFUS, A. et al. Remotely triggered release from magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, WILEY-VCH Verlag, v. 19, n. 22, p. 3932–3936, 2007. ISSN 1521-4095. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1002/adma.200700091>>.

DING, H.-m.; MA, Y.-q. Interactions between janus particles and membranes. **Nanoscale**, The Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 4, p. 1116–1122, 2012. ISSN 2040-3364. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1039/C1NR11425E>>.

DING, H.-m.; MA, Y.-q. Role of physicochemical properties of coating ligands in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 23, p. 5798–5802, ago. 2012. ISSN 0142-9612. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212004942>>.

DING, H.-m.; TIAN, W.-d.; MA, Y.-q. Designing nanoparticle translocation through membranes by computer simulations. **ACS Nano**, American Chemical Society, p. 6, 1230–1238, jan. 2012. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nn2038862>>.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nat Nano**, v. 2, n. 8, p. 469–478, ago. 2007. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2007.223>>.

DVIR, T. et al. Nanowired three-dimensional cardiac patches. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 11, p. 720–725, nov. 2011. ISSN 1748-3387. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.160>>.

DVIR, T. et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 6, n. 1, p. 13–22,

jan. 2011. ISSN 1748-3387. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2010.246>>.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. **J. Chem. Phys.**, AIP, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, nov. 1995. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1063/1.470117>>.

FAITH, J. J. et al. Large-scale mapping and validation of escherichia coli transcriptional regulation from a compendium of expression profiles. **PLoS Biol**, 2007.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Rev. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, mar. 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1566>>.

FISCHBACH, C. et al. Engineering tumors with 3d scaffolds. **Nat Meth**, v. 4, n. 10, p. 855–860, out. 2007. ISSN 1548-7091. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1085>>.

FISCHBACH, C. et al. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3d culture and integrin engagement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 399–404, 2009. Disponível em:  
<<http://www.pnas.org/content/106/2/399.abstract>>.

GOTTLIEB, A. et al. Principle: A tool for associating genes with diseases via network propagation. **Bioinformatics**, 2011. Disponível em:  
<<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2011/10/20/bioinformatics.btr584.abst>>.

HANLEY, C. et al. Preferential killing of cancer cells and activated human t cells using zno nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 29, p. 295103–, 2008. ISSN 0957-4484. Disponível em:  
<<http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=29/a=295103>>.

HARRIS, T. J. et al. Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 998 – 1006, 2010. ISSN 0142-9612. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209010874>>.

HARUSH-FRENKEL, O. et al. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 353, n. 1, p. 26–32, fev. 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X06025642>>.

HERCE, H. D.; GARCIA, A. E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the hiv-1 tat peptide across lipid membranes.

**Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, n. 52, p. 20805–20810, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/104/52/20805.abstract>>.

HONG, H. et al. Cancer-targeted optical imaging with fluorescent zinc oxide nanowires. **Nano Letters**, v. 11, n. 9, p. 3744–3750, 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl201782m>>.

HONG, S. et al. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: Hole formation and the relation to transport. **Bioconjugate Chem.**, American Chemical Society, v. 15, n. 4, p. 774–782, jun. 2004. ISSN 1043-1802. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bc049962b>>.

HUANG, P. et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. **Nature**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 475, n. 7356, p. 386–389, jul. 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature10116>>.

HUTMACHER, D. W. Biomaterials offer cancer research the third dimension. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 2, p. 90–93, fev. 2010. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2619>>.

HUTMACHER, D. W. et al. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? **Trends Biotechnol**, Elsevier Science Publishers, v. 28, n. 3, p. 125–133, mar. 2010. ISSN 0167-7799. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779909002224>>.

IEDA, M. et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. **Cell**, Elsevier, v. 142, n. 3, p. 375–386, 2010. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(10\)00771-3](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(10)00771-3)>.

JEWELL, C. M. et al. Oligonucleotide delivery by cell-penetrating striped nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, WILEY-VCH Verlag, v. 50, n. 51, p. 12312–12315, 2011. ISSN 1521-3773. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201104514>>.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 3, p. 145–150, mar. 2008. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2008.30>>.

KENNEDY-CRISPIN, M. et al. Human keratinocytes' response to injury upregulates ccl20 and other genes linking innate and adaptive immunity. **J Invest Dermatol**, The Society for Investigative Dermatology, Inc, v. 132, n. 1, p. 105–113, jan. 2012. ISSN 0022-202X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.262>>.

KENNEDY, L. C. et al. A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. **Small**, WILEY-VCH Verlag, v. 7, n. 2, p. 169–183, 2011. ISSN 1613-6829. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/smll.201000134>>.

KIM, E.-Y. et al. Gold nanoparticle-mediated gene delivery induces widespread changes in the expression of innate immunity genes. **Gene Ther**, Macmillan Publishers Limited, v. 19, n. 3, p. 347–353, mar. 2012. ISSN 0969-7128. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2011.95>>.

KIM, J.; MOONEY, D. J. In vivo modulation of dendritic cells by engineered materials: Towards new cancer vaccines. **Nano Today**, v. 6, n. 5, p. 466–477, out. 2011. ISSN 1748-0132. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013211000946>>.

KIM, J. B. et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. **Cell**, Elsevier, v. 136, n. 3, p. 411–419, 2009. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(09\)00071-3](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(09)00071-3)>.

KRETZ, M. et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding rna tincr. **Nature**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 493, n. 7431, p. 231–235, jan. 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11661>>.

LAI, K. et al. Computer simulation study of nanoparticles interact with lipid membrane under mechanical stress. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, The Royal Society of Chemistry, p. –, 2012. ISSN 1463-9076. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2CP42027A>>.

LAL, S.; CLARE, S. E.; HALAS, N. J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: Impending clinical impact. **Acc. Chem. Res.**, American Chemical Society, v. 41, n. 12, p. 1842–1851, nov. 2008. ISSN 0001-4842. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ar800150g>>.

LEE, H.; LARSON, R. G. Molecular dynamics simulations of pamam dendrimer-induced pore formation in dppc bilayers with a coarse-grained model. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 110, n. 37, p.

18204–18211, ago. 2006. ISSN 1520-6106. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1021/jp0630830>>.

LEE, J. et al. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3d cell culture. **Small**, WILEY-VCH Verlag, v. 5, n. 10, p. 1213–1221, 2009. ISSN 1613-6829. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/sml.200801788>>.

LEISNER, M. et al. Rationally designed logic integration of regulatory signals in mammalian cells. **Nat Nano**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 9, p. 666–670, set. 2010. ISSN 1748-3387. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2010.135>>.

LI, Y.; CHEN, X.; GU, N. Computational investigation of interaction between nanoparticles and membranes: Hydrophobic/hydrophilic effect. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 112, n. 51, p. 16647–16653, nov. 2008. ISSN 1520-6106. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1021/jp8051906>>.

LI, Y.; GU, N. Thermodynamics of charged nanoparticle adsorption on charge-neutral membranes: A simulation study. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 114, n. 8, p. 2749–2754, fev. 2010. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp904550b>>.

LIN, J. et al. Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. **ACS Nano**, American Chemical Society, v. 4, n. 9, p. 5421–5429, ago. 2010. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nn1010792>>.

LIN, J.-Q. et al. A simulation study on nanoscale holes generated by gold nanoparticles on negative lipid bilayers. **Langmuir**, American Chemical Society, v. 27, n. 13, p. 8323–8332, jun. 2011. ISSN 0743-7463. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la201086u>>.

LOH, Y.-H. et al. Reprogramming of t cells from human peripheral blood. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 15–19, jul. 2010. ISSN 1934-5909. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590910002869>>.

LOO, C. et al. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. **Nano Letters**, v. 5, n. 4, p. 709–711, 2005. Disponível em:  
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl050127s>>.

LOUHIVUORI, M. et al. Release of content through mechano-sensitive gates in pressurized liposomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, n. 46, p.

19856–19860, nov. 2010. Disponível em:  
<<http://www.pnas.org/content/107/46/19856.abstract>>.

MALTZAHN, G. von et al. Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3892–3900, 2009. Disponível em:  
<<http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/9/3892.abstract>>.

MALTZAHN, G. von et al. Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group, v. 10, n. 7, p. 545–552, jul. 2011. ISSN 1476-1122. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nmat3049>>.

MAO, T. et al. Pka phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1alpha to glucagon signaling in glucose metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15852–15857, set. 2011.

MARRINK, S. J.; MARK, A. E. The mechanism of vesicle fusion as revealed by molecular dynamics simulations. **J. Am. Chem. Soc.**, American Chemical Society, v. 125, n. 37, p. 11144–11145, ago. 2003. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja036138+>>.

MARRINK, S. J.; MARK, A. E. Molecular dynamics simulation of the formation, structure, and dynamics of small phospholipid vesicles. **J. Am. Chem. Soc.**, American Chemical Society, v. 125, n. 49, p. 15233–15242, nov. 2003. ISSN 0002-7863. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1021/ja0352092>>.

MARRINK, S. J. et al. The martini force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 111, n. 27, p. 7812–7824, jun. 2007. ISSN 1520-6106. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1021/jp071097f>>.

MARRINK, S. J.; VRIES, A. H. de; MARK, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. **J. Phys. Chem. B**, American Chemical Society, v. 108, n. 2, p. 750–760, dez. 2003. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp036508g>>.

MARTÍNEZ, L. et al. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **J. Comput. Chem.**, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 30, n. 13, p. 2157–2164, 2009. ISSN 1096-987X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21224>>.

MORRIS, S. et al. Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via cellnet. **Cell**, Elsevier, v. 158, n. 4, p. 889–902. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(14\)00935-0](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(14)00935-0)>.

MURRY, C. E.; KELLER, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. **Cell**, Elsevier, v. 132, n. 4, p. 661–680, 2008. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(08\)00216-X](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(08)00216-X)>.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 7, p. 543–557, jul. 2009. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2442>>.

PARK, J.-H. et al. Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/early/2009/12/23/0909565107.abstract>>.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 12, p. 751–760, dez. 2007. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2007.387>>.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Rev. Drug Discov.**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 9, n. 8, p. 615–627, ago. 2010. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2591>>.

PLIMPTON, S. Fast parallel algorithms for short-range molecular dynamics. **J. Comput. Phys.**, v. 117, n. 1, p. 1–19, mar. 1995. ISSN 0021-9991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199918571039X>>.

POLAND, C. A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 7, p. 423–428, jul. 2008. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2008.111>>.

POON, Z. et al. Layer-by-layer nanoparticles with a ph-sheddable layer for in vivo targeting of tumor hypoxia. **ACS Nano**, American Chemical Society, v. 5, n. 6, p. 4284–4292, abr. 2011. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nn200876f>>.

QIAN, X. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced raman nanoparticle tags. **Nat Biotech**, Nature Publishing Group, v. 26, n. 1, p. 83–90, jan. 2008. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1377>>.

RAMALHO, J. P. P.; GKEKA, P.; SARKISOV, L. Structure and phase transformations of dppc lipid bilayers in the presence of nanoparticles: Insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. **Langmuir**, American Chemical Society, v. 27, n. 7, p. 3723–3730, mar. 2011. ISSN 0743-7463. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/la200236d>>.

ROCHA, E.; PORTO, L.; RAMBO, C. Nanotechnology meets 3d in vitro models: Tissue engineered tumors and cancer therapies. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, n. 0, p. 270–279, jan. 2014. ISSN 0928-4931. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493113005250>>.

ROCHA, E. L. d.; CARAMORI, G. F.; RAMBO, C. R. Nanoparticle translocation through a lipid bilayer tuned by surface chemistry. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, The Royal Society of Chemistry, v. 15, n. 7, p. 2282–2290, 2013. ISSN 1463-9076. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2CP44035K>>.

RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N.; SAILOR, M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. **The J. Cell Biol.**, v. 188, n. 6, p. 759–768, 2010. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/188/6/759.abstract>>.

SCHROEDER, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature Rev. Cancer**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 12, n. 1, p. 39–50, jan. 2012. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3180>>.

SEKIYA, S.; SUZUKI, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 475, n. 7356, p. 390–393, jul. 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature10263>>.

SHI, J. et al. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223–3230, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl102184c>>.

SHI, X. et al. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 6,

n. 11, p. 714–719, nov. 2011. ISSN 1748-3387. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.151>>.

SHUBAYEV, V. I.; II, T. R. P.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 467 – 477, 2009. ISSN 0169-409X. <ce:title>Identifying and Assessing Biomaterial Nanotoxicity in Translational Research for Preclinical Drug Development</ce:title>. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09001045>>.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; JR, J. R. B. Applications of nanotechnology for immunology. **Nat Rev Immunol**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 13, n. 8, p. 592–605, ago. 2013. ISSN 1474-1733. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nri3488>>.

SPOEL, D. V. D. et al. Gromacs: Fast, flexible, and free. **J. Comput. Chem.**, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005. ISSN 1096-987X. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>>.

STAERK, J. et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 20–24, jul. 2010. ISSN 1934-5909. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590910002845>>.

STEPHAN, M. T. et al. Therapeutic cell engineering with surface-conjugated synthetic nanoparticles. **Nat Med**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 16, n. 9, p. 1035–1041, set. 2010. ISSN 1078-8956. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2198>>.

SUN, Y.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2176–2179, 2002. Disponível em:  
<<http://www.sciencemag.org/content/298/5601/2176.abstract>>.

SZABO, E. et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. **Nature**, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., v. 468, n. 7323, p. 521–526, nov. 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nature09591>>.

SZOT, C. S. et al. Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 1, p. 37 – 42,

2011. ISSN 0928-4931. <ce:title>Novel Structures for Tissue Engineering</ce:title>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493109003130>>.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Elsevier, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(06\)00976-7](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(06)00976-7)>.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3d cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 103, n. 4, p. 655–663, 2009. ISSN 1097-0290. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/bit.22361>>.

TIMKO, B. P.; DVIR, T.; KOHANE, D. S. Remotely triggerable drug delivery systems. **Advanced Materials**, WILEY-VCH Verlag, v. 22, n. 44, p. 4925–4943, 2010. ISSN 1521-4095. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/adma.201002072>>.

TONG, L. et al. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. **Advanced Materials**, WILEY-VCH Verlag, v. 19, n. 20, p. 3136–3141, 2007. ISSN 1521-4095. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/adma.200701974>>.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. Tophat: discovering splice junctions with rna-seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/9/1105.abstract>>.

VÁCHA, R.; MARTINEZ-VERACOECHEA, F. J.; FRENKEL, D. Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes. **Nano Lett.**, American Chemical Society, v. 11, n. 12, p. 5391–5395, nov. 2011. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nl2030213>>.

VANDIN, F. et al. Algorithms for detecting significantly mutated pathways in cancer. **Journal of Computational Biology**, 2011.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. **Small**, WILEY-VCH Verlag, v. 6, n. 1, p. 12–21, 2010. ISSN 1613-6829. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/smll.200901158>>.

VERMA, A. et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group,

v. 7, n. 7, p. 588–595, jul. 2008. ISSN 1476-1122. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2202>>.

VIERBUCHEN, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature**, Macmillan Publishers Limited. All rights reserved, v. 463, n. 7284, p. 1035–1041, fev. 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08797>>.

WALLACE, E. J.; SANSOM, M. S. P. Blocking of carbon nanotube based nanoinjectors by lipids: A simulation study. **Nano Lett.**, American Chemical Society, v. 8, n. 9, p. 2751–2756, jul. 2008. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nl801217f>>.

WANG, Y.-L.; LU, Z.-Y.; LAAKSONEN, A. Specific binding structures of dendrimers on lipid bilayer membranes. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, The Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 23, p. 8348–8359, 2012. ISSN 1463-9076. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2CP40700K>>.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Rev. Drug Discov.**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 2, p. 129–138, fev. 2009. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2742>>.

WONG-EKKABUT, J. et al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 6, p. 363–368, jun. 2008. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2008.130>>.

XIE, H. et al. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. **Cell**, Elsevier, v. 117, n. 5, p. 663–676. Disponível em:  
<[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(04\)00419-2](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(04)00419-2)>.

XIE, Z. et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1307–1311, 2011. Disponível em:  
<<http://www.sciencemag.org/content/333/6047/1307.abstract>>.

YAN, L.-T.; YU, X. Enhanced permeability of charged dendrimers across tense lipid bilayer membranes. **ACS Nano**, American Chemical Society, v. 3, n. 8, p. 2171–2176, jul. 2009. ISSN 1936-0851. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1021/nn9004236>>.

YANG, K.; MA, Y.-Q. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. **Nat. Nanotechnol.**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 8, p. 579–583, ago. 2010. ISSN 1748-3387. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2010.141>>.

YAVUZ, M. S. et al. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 12, p. 935–939, dez. 2009. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2564>>.

YEGER-LOTEM, E. et al. Bridging high-throughput genetic and transcriptional data reveals cellular responses to alpha-synuclein toxicity. **Nat Genet**, Nature Publishing Group, v. 41, n. 3, p. 316–323, mar. 2009. ISSN 1061-4036. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.337>>.

YI, C. et al. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 mapk pathway. **ACS Nano**, American Chemical Society, v. 4, n. 11, p. 6439–6448, out. 2010. ISSN 1936-0851. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/nn101373r>>.

ZHANG, H. et al. A strategy for zno nanorod mediated multi-mode cancer treatment. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1906 – 1914, 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210014663>>.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66 – 80, 2009. ISSN 1748-0132. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013208000182>>.

ZHENG, B. et al. Pgc-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 52, p. 52ra73–52ra73, out. 2010.

ZHOU, J. et al. Biodegradable poly(amine-co-ester) terpolymers for targeted gene delivery. **Nat. Mater.**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, p. 82–90, jan. 2012. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat3187>>.

ZHOU, Q. et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to [bgr]-cells. **Nature**, Macmillan Publishers Limited. All rights reserved, v. 455, n. 7213, p. 627–632, out. 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07314>>.