



MICELAS DE PEG-PCL-MALEIMIDA COMO SISTEMA DE ENTREGA DE
siRNA PARA TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS T

Giovanna Barbosa Frensel

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Flávia Raquel Gonçalves

Carneiro

Rio de Janeiro
Março de 2026

MICELAS DE PEG-PCL-MALEIMIDA COMO SISTEMA DE ENTREGA DE
SIRNA PARA TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS T

Giovanna Barbosa Frensel

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE
ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

Aprovada por: Helen Conceição Ferraz

Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

Renata Guimarães Ferreira Alvim

Tiago Albertini Balbino

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2026

Frensel, Giovanna Barbosa

Micelas de PEG-PCL-Maleimida como Sistema de entrega de siRNA para tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T / Giovanna Barbosa Frensel – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2026.

xv, 125 p. : il.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2026.

Referências bibliográficas: p. 104-125.

1. Nanopartículas PEG-PCL-Maleimida 2. *Drug Delivery*
3. siRNA
 - I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Micelas de PEG-PCL-Maleimida como sistema de *delivery* de siRNA para tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T

AGRADECIMENTOS

Acredito que mudar de área nunca é fácil — e fazer isso saindo da Biologia para ingressar em uma pós-graduação em Engenharia, menos ainda. Ainda assim, foi uma das melhores decisões que já tomei. Enfrentei muitos desafios (alguns que achei que não superaria), mas aqui estou, com orgulho do caminho percorrido.

Grande parte do corpo de agradecimentos do meu Trabalho de Conclusão de Curso continua presente na minha vida. Agradeço aos meus pais, Flávia e Marco, pelos colos, paciência e conselhos quando tudo parecia desmoronar. Às minhas irmãs, Roberta e Andrea, por serem eternas confidentes. Às minhas amigas-irmãs de alma, Ana Luiza, Alice, Giulia e Mariana, por me acolherem e me ouvirem reclamar por horas (e ainda assim me amarem depois disso). À minha guru, Katia, por me mostrar a luz quando eu só via tempestade. À Clara Bakker, por ser minha parceira há tanto tempo que já nem sei como seria sem essa união. E à Luana e Mari, porque fazer novas amizades na vida adulta é difícil, mas vocês foram doces exceções.

Com essa jornada, conheci também pessoas incríveis, sem as quais não imagino como teria sido o caminho. Agradeço à turma de Mestrado PEQ 2024, pelos momentos de descontração e pelas longas horas de estudo na salinha dos alunos. À equipe do LABEFIT, por acolher como ninguém. Um agradecimento especial ao Vinícius Towesend — gosto de acreditar que nossas conversas deixaram este trabalho o melhor que ele poderia ser. À minha colega (e hoje amiga) Gabi Arcanjo, foi ótimo encontrar uma alma gêmea nessa trajetória. Ao Patrick, que esteve presente como apoio desde o primeiro dia. Aos membros “avulsos” do PEQ, que, mesmo sem vínculo direto, foram pessoas de luz sempre dispostas a ajudar. E ao INCA e seus membros, pela disponibilidade e atenção.

Por fim, agradeço às minhas orientadoras, Helen e Flávia. Considero-me muito sortuda por ter encontrado duas mulheres fortes e sábias, num meio ainda majoritariamente masculino. Obrigada não só pela orientação científica, mas pela inspiração ao longo de todo o caminho.

Obrigada.

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a caracterização físico-química de uma plataforma nanocarreadora estruturada por meio da técnica de montagem multicamada (*Layer-by-Layer* – LbL), utilizando micelas de PEG-PCL-Maleimida como núcleo polimérico. O sistema foi projetado para a entrega de siRNA, incorporado à estrutura por adsorção física superficial, visando o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda de células T (LLA-T) como uma estratégia de medicina de precisão para pacientes com prognósticos desafiadores. Os núcleos micelares, sintetizados por nanoprecipitação e estabilizados com Poloxamer 407 (1%), resultaram em partículas monodispersas de 72,6 nm, com estabilidade dimensional sugerida por 60 dias sob refrigeração. A caracterização eletrocinética revelou um perfil de potencial elétrico estável (-13,0 mV em pH 5,0, utilizando água Milli-Q como meio dispersante) e ponto isoelétrico inferior a 2,0, assegurando estabilidade coloidal em pH fisiológico. A investigação da interface coloidal foi validada por modelagem matemática (Modelo de Hill), revelando um mecanismo de adsorção cooperativa de RNA ($p = -10,6$). A arquitetura multicamada foi confirmada por sucessivas inversões de carga, onde o potencial zeta transitou de -9,3 mV para +15,8 mV após a complexação da Poli-L-Arginina (PLA), retornando a -10,7 mV com o recobrimento de Ácido Hialurônico (HA). Esta última etapa induziu fenômenos de *bridging*, elevando o diâmetro hidrodinâmico para patamares de 200 nm. Ensaios de citometria de fluxo em linhagens Jurkat e MOLT-4 indicaram ausência de internalização citoplasmática significativa do siRNA no intervalo avaliado, sugerindo que o incremento dimensional pós-recobrimento influencia a cinética de captação. Ainda, as análises sugeriram preservação da viabilidade celular nas condições teste, indicando um perfil preliminar de biocompatibilidade. O estudo conclui, portanto, que a engenharia do nanovetor é tecnicamente viável, estabelecendo parâmetros para o refinamento da estabilidade, contudo, buscando futuramente um ajuste para a manutenção do tamanho hidrodinâmico ideal descrito na literatura, e da interação biológica da plataforma. Esses achados abrem caminho para ensaios quantitativos de viabilidade e testes de silenciamento, servindo como ponto de partida para novas estratégias no tratamento da leucemia.

Palavras-chave: LLA-T; Nanopartículas Poliméricas; PEG-PCL-Maleimida; siRNA; *Layer-by-Layer*; Terapia Avançada.

ABSTRACT

The present study describes the development and physicochemical characterization of a nanocarrier platform structured through the layer-by-layer (LbL) assembly technique, utilizing PEG-PCL-Maleimide micelles as the polymeric core. The system was designed for the delivery of siRNA, incorporated into the structure via superficial physical adsorption, aiming at the treatment of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) as a precision medicine strategy for patients with challenging prognoses. The micellar cores, synthesized by nanoprecipitation and stabilized with Poloxamer 407 (1%), resulted in monodisperse particles of 72.6 nm, with dimensional stability suggested for 60 days under refrigeration. Electrokinetic characterization revealed a stable electrical potential profile (−13.0 mV in pH 5.0, using Milli-Q water as the dispersing medium) and an isoelectric point below 2.0, ensuring colloidal stability at physiological pH. The investigation of the colloidal interface was validated by mathematical modeling (Hill Model), revealing a cooperative RNA adsorption mechanism ($p = -10.6$). The multilayer architecture was confirmed by successive charge inversions, where the zeta potential transitioned from −9.3 mV to +15.8 mV after Poly-L-Arginine (PLA) complexation, returning to −10.7 mV following Hyaluronic Acid (HA) coating. This final step induced bridging phenomena, increasing the hydrodynamic diameter to levels around 200 nm. Flow cytometry assays in Jurkat and MOLT-4 lineages indicated the absence of significant cytoplasmic siRNA internalization within the evaluated interval, suggesting that the post-coating dimensional increase influences uptake kinetics. Furthermore, the analyses suggested the preservation of cell viability under the test conditions, indicating a preliminary biocompatibility profile. The study concludes, therefore, that the engineering of the nanovector is technically feasible, establishing parameters for the refinement of stability; however, future work should seek to adjust the maintenance of the ideal hydrodynamic size described in the literature and the biological interaction of the platform. These findings pave the way for quantitative viability assays and silencing tests, serving as a starting point for new strategies in leukemia treatment.

Keywords: T-ALL; Polymeric Nanoparticles; PEG-PCL-Maleimide; siRNA; Layer-by-Layer; Advanced Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da arquitetura do nanovetor estruturado via montagem multicamada por interação eletrostática.	18
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de interferência por RNA.....	29
Figura 3. Distribuição do diâmetro de nanopartículas em diferentes condições de síntese	55
Figura 4. Estabilidade temporal da distribuição de tamanho NP de PEG-PCL-Mal (P407 1%).....	58
Figura 5. Variação do Potencial Zeta em Função do pH da NP de PEG-PCL-Mal (P407 1%).....	61
Figura 6. Verificação visual de esterilidade e ausência de turbidez em meio de cultura.	63
Figura 7. Porcentagem de RNA adsorvido nas nanopartículas em função da proporção mássica de mg de RNA por 1 mg de NP. O	66
Figura 8. Isotherma de adsorção do RNA de levedura nas nanopartículas.	68
Figura 9. Variação do Potencial Zeta das Nanopartículas em função da proporção de RNA de levedura adicionado.....	70
Figura 10. Ensaio de Eletroforese em Gel de Agarose para Avaliação da Complexação de RNA a NP de PEG-PCL-Mal.	72
Figura 11. Ajuste dos dados experimentais de potencial zeta ao modelo de Langmuir Exponencial.	76
Figura 12. Ajuste dos dados experimentais de potencial zeta ao modelo Sigmoidal Dose-Resposta	78
Figura 13. Distribuição de tamanho por intensidade das NP-RNA-PLA antes e após o refino físico.....	80
Figura 14. Avaliação por citometria de fluxo da internalização de complexos NP-siRNA em linhagem Jurkat após 4 horas de incubação.....	88
Figura 15. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular da plataforma multicamada em linhagem Jurkat após 4 horas de incubação.....	90

Figura 16. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem Jurkat após 24 horas de incubação.....	92
Figura 17. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular da plataforma multicamada em linhagem Jurkat após 24 horas de incubação.....	93
Figura 18. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem MOLT-4 após 4 horas de incubação.....	95
Figura 19. Avaliação da eficiência por citometria de fluxo de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem MOLT-4 após 24 horas de incubação.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas sintetizadas em diferentes formulações.....	57
Tabela 2. Acompanhamento da estabilidade da carga superficial das formulação selecionada.....	62
Tabela 3. Parâmetros estatísticos e físico-químicos obtidos pelos modelos de Langmuir Exponencial e Sigmoidal.	74
Tabela 4. Comparação de Potencial Zeta da NP antes e após o recobrimento com PLA	79
Tabela 5. Acompanhamento da carga superficial da NP-RNA-PLA-HA em diferentes razões de HA	81
Tabela 6. Monitoramento do potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico médio durante a montagem LbL.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAV – Vírus adeno-associados
- AdV – Adenovírus
- allo-HSCT – Transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico
- ARAC – Citarabina
- AuNPs – Nanopartículas de ouro
- CAR T-cells – Células T com receptor de antígeno quimérico
- CD44 – Receptor de hialuronato (*Cluster of Differentiation 44*)
- CDs – Ciclodextrinas
- CMC – Concentração micelar crítica
- CRISPR/Cas9 – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- D – Coeficiente de difusão
- DLS – Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*)
- DPR% – Desvio padrão relativo percentual
- DRM – Doença residual mínima
- dsRNA – RNA de fita dupla (*double-stranded RNA*)
- ELS – Espalhamento de luz eletroforético (*Electrophoretic Light Scattering*)
- ϵ – Constante dielétrica
- $f(k\alpha)$ – Função de Henri
- FAMTM – Fluoróforo de fluoresceína (6-carboxifluoresceína)
- HA – Ácido hialurônico
- η – Viscosidade do meio
- INCA – Instituto Nacional de Câncer
- JAK-STAT – *Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription*
- KB – Constante de Boltzmann

LbL – Camada por camada (*Layer-by-Layer*)

LDH – Lactato desidrogenase

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LLA-T – Leucemia linfoblástica aguda de células T

LLA-TPE – Leucemia linfoblástica aguda de precursor de células T precoce

LMA – Leucemia mieloide aguda

LMC – Leucemia mieloide crônica

LNPs – Nanopartículas lipídicas

LV – Lentivírus

m – Massa (utilizada em modelos de adsorção)

miRNA – Micro RNA

MSNs – Nanopartículas de sílica mesoporosa

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MTX – Metotrexato

MWCO – Corte de peso molecular (*Molecular Weight Cut-Off*)

NOTCH1 – *Neurogenic locus notch homolog protein 1*

NPs – Nanopartículas

p – Coeficiente de Hill (grau de cooperatividade)

P407 – Poloxamer 407

PAMAM – Poli(amidoamina)

PCL – Poli(ϵ -caprolactona)

PEG – Polietilenoglicol

PEG-PCL-Mal – Copolímero de polietilenoglicol-poli(epsilon-caprolactona)-maleimida

PEI – Polietilenimina

PES – Polietersulfona

pH – Potencial hidrogeniônico

π – Constante Pi (3,1415...)

pI – Ponto isoelétrico

PLA – Poli-L-arginina

PLGA – Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PTGS – Silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-Transcriptional Gene Silencing*)

PTK7 – Proteína tirosina quinase 7

PVA – Álcool polivinílico

R² – Coeficiente de determinação (ajuste estatístico)

RH – Raio hidrodinâmico

R/R – Recidivada ou refratária

RISC – Complexo indutor de silenciamento de RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*)

RNAi – RNA de interferência

RPMI 1640 – *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa

RV – Retrovírus

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

shRNA – *Short hairpin RNA*

siRNA – Pequeno RNA de interferência (*Small interfering RNA*)

SPIONs – Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

T – Temperatura absoluta

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

UV-Vis – Espectrofotometria no ultravioleta-visível

WGS – Sequenciamento do genoma inteiro (*Whole Genome Sequencing*)

WST-8 – Sal de tetrazólio solúvel em água

ζ – Potencial zeta

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Introdução	16
1.1. Justificativa e Relevância do Trabalho	16
1.2. Objetivos.....	17
1.2.1. Objetivo Geral	17
1.2.2. Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO II: Revisão bibliográfica.....	20
2.1. Leucemia linfoblástica aguda das células T	20
2.1.1. Contexto e Panorama Epidemiológico da LLA-T	20
2.1.2 Fisiopatologia e Bases Moleculares	22
2.1.3. Abordagens Terapêuticas Atuais e Suas Limitações	25
2.2. Terapia Alvo com RNA de Interferência (siRNA).....	28
2.2.1. Silenciamento gênico por RNA de Interferência.....	28
2.2.2.Potencial Terapêutico do RNAi para LLA-T	29
2.2.3. Superação das Barreiras para Aplicação Clínica.....	31
2.3. Nanopartículas como Sistemas de Entrega para siRNA.....	32
2.3.1. O Papel dos Vetores na Superação das Barreiras Biológicas.....	32
2.3.2. Estado da Arte: Vetores Virais e Não Virais.....	34
2.3.3 .Micelas de PEG-PCL.....	37
2.3.4. A Estratégia de Montagem <i>Layer-by-Layer</i> para Complexação do siRNA	39
CAPÍTULO III: Metodologia.....	43
3.1. Materiais e reagentes	43
3.2. Síntese e Caracterização das Nanopartículas Poliméricas.....	43
3.2.1. Protocolo de Síntese das NPs por nanoprecipitação.....	43

3.2.2. Tamanho e Polidispersão	44
3.2.3. Potencial Zeta e Ponto Isoelétrico (pI)	46
3.2.4. Esterilidade	47
3.3. Ensaio de Adsorção de RNA	48
3.3.1. Eficiência de Adsorção	48
3.3.1 Modelagem Matemática e Análise dos Parâmetros de Adsorção.....	50
3.4. Montagem Multicamada e Internalização Celular.....	51
3.4.1. Procedimento de Montagem Multicamada (LbL)	51
3.4.2. Caracterização das NPs Recobertas.....	51
3.4.3. Ensaio de Internalização Celular	52
CAPÍTULO IV: Resultados e Discussão	54
4.1. Síntese e Caracterização das NPs	54
4.1.1. Tamanho e Polidispersão	54
4.1.2. Potencial Zeta e Ponto Isoelétrico (pI)	59
4.1.3. Esterilidade	63
4.2. Resultados do Estudo de Adsorção de RNA	64
4.2.1. Eficiência de Adsorção	64
4.2.2 Modelagem Matemática e Análise dos Parâmetros de Adsorção.....	73
4.3. Montagem Multicamada e Internalização Celular.....	78
4.3.1. Efeito do Recobrimento nas Propriedades das NPs.....	78
4.3.2. Análise da Internalização Celular	84
CAPÍTULO V: Conclusão	100
5.1. Conclusões Gerais do Trabalho	100
5.2. Perspectivas e Trabalhos Futuros	102
CAPÍTULO VI: Referências bibliográficas	104

CAPÍTULO I: Introdução

1.1. Justificativa e Relevância do Trabalho

O câncer configura-se como um dos maiores desafios de saúde pública global, caracterizando-se pela proliferação descontrolada de células geneticamente transformadas que favorecem clones progressivamente resistentes e agressivos. No espectro das neoplasias hematológicas, a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é definida pela expansão anormal de linfoblastos e seu acúmulo na medula óssea, comprometendo a hematopoiese normal e resultando em um curso clínico severo. Entre seus subtipos, a Leucemia Linfoblástica Aguda de células T (LLA-T) destaca-se como uma patologia de alto risco, correspondendo a aproximadamente 15% dos casos pediátricos e 25% dos diagnósticos em adultos. Neste caso, alterações genéticas específicas interrompem a maturação regulada dos timócitos no timo, causando um bloqueio na diferenciação e a proliferação aberrante de precursores imaturos de células T. Dentre essas alterações estão mutações ativadoras no oncogene *NOTCH1* (presentes em 69% dos casos), deleções nos genes supressores de tumor *CDKN2A/B*, além de translocações cromossômicas que resultam em aumento de expressão de um grupo diverso de fatores de transcrição que funcionam como oncogenes.

Apesar da consolidação de protocolos quimioterápicos multiagentes intensivos, que buscam remissões profundas, recidiva a LLA-T recidivada ou refratária apresenta um prognóstico extremamente desfavorável, com taxas de sobrevida frequentemente abaixo de 25%. A quimioterapia convencional, embora eficaz em muitos casos, é acompanhada por toxicidades sistêmicas severas, incluindo danos hepáticos e pancreatite, e falha em eliminar a Doença Residual Mínima (DRM) em subtipos de alto risco, o que impulsiona a busca por estratégias de medicina de precisão, como a terapia gênica baseada em RNA de interferência (RNAi). A tecnologia de RNAi permite o silenciamento gênico pós-transcricional de alvos críticos, mas sua aplicação clínica enfrenta obstáculos como a rápida degradação por nucleases séricas e a dificuldade de entrega em tecidos extra-hepáticos.

Nesse cenário, os sistemas de entrega artificiais, particularmente as nanopartículas poliméricas, emergem como uma alternativa promissora para esse uso terapêutico por oferecerem considerável biossegurança, baixa imunogenicidade e versatilidade sintética, principalmente quando comparado aos vetores virais. Entre as plataformas orgânicas, as micelas baseadas em copolímeros anfifílicos, como o PEG-PCL-Maleimida, destacam-se pela estrutura auto-organizada de núcleo-casca. Assim, o núcleo de policaprolactona (PCL) promove a estabilidade estrutural e o encapsulamento de cargas, enquanto a coroa de polietilenoglicol (PEG) confere o efeito *stealth*, prolongando a circulação sistêmica ao evitar a captura pelo Sistema Fagocitário Mononuclear. Paralelamente, a funcionalização com maleimida atua como um sítio estratégico, provendo versatilidade para funcionalizações posteriores; no contexto desta plataforma esse grupamento atua na coordenação do material genético junto à superfície da partícula, viabilizando a retenção da carga, o que pode apresentar resultados ainda mais expressivos caso o siRNA seja quimicamente modificado com a inserção de um grupo tiol terminal. Para potencializar a entrega do material genético, a estratégia de montagem *Layer-by-Layer* (LbL) permite o carregamento da nanopartícula por meio da deposição eletrostática sequencial do siRNA, isto é, a sua carga terapêutica, e de polieletrólitos complementares. Esta técnica, portanto, possibilita a incorporação do siRNA com uma camada formadora da arquitetura da nanopartícula, seguida de recobrimento por materiais como a Poli-L-Arginina (PLA) e o Ácido Hialurônico (HA), criando nanovetores inteligentes capazes de proteger a carga genética da degradação enzimática, promover o escape endossomal e realizar o direcionamento seletivo às células tumorais via receptores CD44, assim possibilitando que o siRNA possa ter seu efeito de silenciamento gênico.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo central deste estudo é o desenvolvimento e a caracterização físico-química de uma plataforma nanocarreadora para o tratamento da LLA-T. A estratégia baseia-se na estruturação de um nanovetor via montagem multicamada (LbL), partindo de um núcleo hidrofóbico de PEG-PCL-Mal complexado ao siRNA por meio de uma

adsorção física gerada por diferença de cargas, conforme ilustra a Figura 1. A arquitetura prossegue com a deposição sequencial de PLA, polieletrólito catiônico biodegradável selecionado por sua alta densidade de carga e propriedades tamponantes, fundamentais para promover o escape endossomal e garantir a entrega citoplasmática da carga terapêutica.

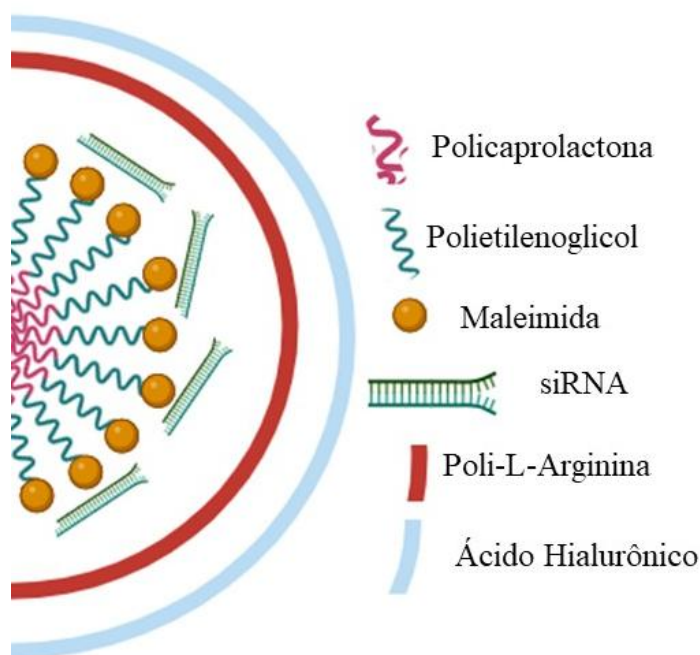


Figura 1. Representação esquemática da arquitetura do nanovetor estruturado via montagem multicamada por interação eletrostática. O sistema é composto por um núcleo hidrofóbico de Policaprolactona (PCL), uma coroa hidrofílica de Polietilenoglicol (PEG) funcionalizada com Maleimida e siRNA, recobertos sucessivamente por camadas de Poli-L-Arginina (PLA) e Ácido Hialurônico (HA).

A etapa final consiste na incorporação do Ácido Hialurônico como camada externa. A presença do HA visa neutralizar o potencial citotóxico dos polycations internos, conferir proteção física contra a degradação enzimática e aumentar a biocompatibilidade sistêmica do nanovetor. Adicionalmente, o HA atua como ligante para o reconhecimento ativo de receptores CD44, frequentemente superexpressos em linhagens celulares de LLA-T, visando uma internalização celular seletiva e mediada por receptores.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o núcleo polimérico de PEG-PCL-Mal quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga superficial estabilidade temporal, esterilidade e citotoxicidade;
- Investigar a eficiência de adsorção do material genético via interações eletrostáticas, utilizando o RNA de levedura como modelo para a validação inicial dos parâmetros de saturação, seguida da aplicação do protocolo ao siRNA para a consolidação do sistema nanovetorizado.
- Propor modelos de isotermas para auxiliar a compreensão dos mecanismos de interação na interface coloidal.
- Validar a montagem da arquitetura multicamada através do monitoramento da inversão de carga superficial e da variação de tamanho após deposição sequencial de Poli-L-Arginina e Ácido Hialurônico.
- Realizar ensaios preliminares de internalização citoplasmática da plataforma final (NP-RNA-PLA-HA) em linhagens de LLA-T (Jurkat e MOLT-4) para avaliar a viabilidade biológica e a estabilidade inicial do nanovetor em meio de cultura.

CAPÍTULO II: Revisão bibliográfica

2.1. Leucemia linfoblástica aguda das células T

2.1.1. Contexto e Panorama Epidemiológico da LLA-T

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, destacando-se como uma das principais causas de morte (INCA, 2022). Esta é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células genética e epigeneticamente transformadas, sujeitas à seleção natural, isto é, uma seleção interna do tumor, em que clones celulares cada vez mais agressivos, resistentes e com capacidade acelerada de multiplicação celular (BROWN et.al, 2023). Os cânceres podem ser agrupados em quatro categorias principais, conforme o tipo de célula e tecido de origem: carcinomas, sarcomas, leucemias e linfomas. Os carcinomas, mais comuns, surgem nas células epiteliais. Os sarcomas desenvolvem-se em tecidos de sustentação, como músculos, ossos, cartilagens e tecidos fibrosos. Já as leucemias e os linfomas têm início em células do sistema sanguíneo e linfático, respectivamente (COOPER, 2000).

Como mencionado, a leucemia consiste em uma neoplasia maligna que acomete os glóbulos brancos e, em geral, apresenta origem indefinida. É caracterizada pelo acúmulo de células transformadas na medula óssea, as quais substituem progressivamente as células hematopoéticas normais. Em escala global, a leucemia representou, em 2020, aproximadamente 2,5% de todos os novos casos de câncer e 3,1% de todos os óbitos atribuídos à doença (HUANG *et al.*, 2022). No mesmo período, a leucemia infantil correspondeu a cerca de 33% dos novos diagnósticos de câncer e 31% dos óbitos por câncer entre crianças de 0 a 14 anos, configurando-se como a neoplasia maligna mais incidente na infância (MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI; FARBER; KHEIRI, 2024). A enfermidade apresenta distribuição mundial, com maior prevalência e mortalidade registradas nos países desenvolvidos (TEBBI, 2021).

As leucemias são tradicionalmente classificadas em duas categorias principais, de acordo com a linhagem celular acometida: mieloide e linfoide (ou

linfocítica/linfoblástica). Adicionalmente, conforme o curso clínico, subdividem-se em formas agudas, de evolução rápida e comportamento mais agressivo, e crônicas, de progressão lenta e contínua. Dessa forma, distinguem-se quatro tipos principais: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfoblástica crônica (LLC) (INCA, 2022).

A incidência da leucemia tende a aumentar com o avanço da idade, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária. Observa-se, entretanto, uma distribuição etária característica dos subtipos: a LLA é predominante em crianças menores de 15 anos, enquanto a LMA e a LLC apresentam maior frequência em indivíduos idosos (INCA, 2022).

A LLA é definida pela proliferação anormal e excessiva de células linfoides imaturas, denominadas linfoblastos, que se acumulam na medula óssea e comprometem a hematopoiese normal. Esse processo resulta na redução da produção de plaquetas e hemácias devido a substituição por aqueles acometidos por alterações genéticas, além de interferir na diferenciação das demais células precursoras hematopoéticas. Em condições fisiológicas, tais precursores dariam origem aos linfócitos B e T, elementos essenciais da resposta imunológica adaptativa. O acúmulo de linfoblastos na medula óssea, portanto, constitui o principal mecanismo patogênico da doença (LIMA *et al.*, 2024).

A LLA é classificada conforme a linhagem dos linfoblastos em B ou T, de acordo com o fenótipo das células acometidas. Representa o tipo de câncer mais prevalente na população pediátrica, com maior incidência entre dois e cinco anos de idade (SILVA *et al.*, 2021). A LLA-T, que se caracteriza pela proliferação descontrolada de células T imaturas (timócitos) e pela sua infiltração na medula óssea e no sangue periférico, é considerada uma doença de alto risco, podendo envolver o mediastino, o líquido cefalorraquidiano e outros órgãos linfoides. Em termos epidemiológicos, a LLA-T corresponde a aproximadamente 15% dos casos pediátricos e 25% dos casos em adultos (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024, BARDELLI *et al.*, 2021).

O que desencadeia as alterações no material genético nessas linhagens envolvidas na neoplasia ainda é desconhecido, mas alguns fatores de risco podem estar

associados ao seu desenvolvimento, como histórico familiar de câncer, exposição materna ao tabagismo durante a gravidez e contato com agrotóxicos nesse período (SILVA *et al.*, 2021). É nesse contexto de incerteza etiológica e complexidade genética que se torna crucial identificar os genes desregulados na LLA-T. Liu *et al.* (2017) confirmaram a heterogeneidade das lesões de LLA-T identificando 106 genes-alvo, metade dos quais inéditos. Mais recentemente, Pölönen *et al.* (2024) detectaram mutações recorrentes para 16 genes codificadores não relatados anteriormente, bem como alterações genômicas não codificadoras. Esses estudos indicam que um potencial muito grande para novos alvos terapêuticos ainda precisa ser explorado.

Embora os dados epidemiológicos revelem a gravidade da LLA-T, a compreensão de sua agressividade exige uma análise dos mecanismos intracelulares que desviam o desenvolvimento normal dos tímócitos. A transição para a malignidade decorre de uma cascata de falhas moleculares que conferem resistência e alta capacidade proliferativa às células imaturas. Assim, para entender a resistência e a alta taxa proliferativa dessas células imaturas, torna-se necessário detalhar a fisiopatologia e as bases moleculares da LLA-T, abordando as falhas genéticas que subvertem o desenvolvimento linfóide normal.

2.1.2 Fisiopatologia e Bases Moleculares

A LLA-T é uma neoplasia maligna altamente heterogênea de precursores de células T, diagnosticada pela expressão do marcador CD3 (na superfície da membrana plasmática ou no citoplasma), além de outros marcadores como CD1a, CD2, CD4, CD5, CD7 e CD8. Imunofenotipicamente, a doença é subclassificada nas formas pró-T, pré-T, T cortical e T madura, além do subtipo imaturo ETP-ALL (progenitor de célula T precoce) (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014).

A base da LLA-T reside em alterações no material genético, frequentemente chamadas de modificações *drivers* ou "condutoras", capazes de iniciar a transformação leucêmica (BUCKLEY *et al.*, 2025). No entanto, a LLA-T apresenta uma dificuldade elevada de detecção. Isso ocorre porque aproximadamente 60% desses *drivers* de leucemia envolvem regiões não codificantes do genoma ("ocultas"), ou seja, as partes

que não produzem proteínas (PÖLÖNEN *et al.*, 2024). Essas regiões atuam como reguladores defeituosos, ativando genes promotores de câncer (oncogenes). Um mecanismo altamente prevalente (50% dos casos) é o sequestro de *enhancers*, que são sequências não codificantes de DNA que agem como um "super-interruptor" para amplificar drasticamente a expressão desses oncogenes (PÖLÖNEN *et al.*, 2024). Como as técnicas de sequenciamento padrão, como o Sequenciamento Completo do Exoma (WES), não conseguem identificar essas mudanças ocultas, o Sequenciamento do Genoma Inteiro (WGS) se torna necessário para um diagnóstico completo (PÖLÖNEN *et al.*, 2024). Assim, o WGS é crucial para a caracterização precisa da doença, permitindo a identificação dos *drivers* ocultos, a classificação correta do subtipo, a estratificação de risco e o prognóstico, além da identificação de alvos terapêuticos (BUCKLEY *et al.*, 2025). Análises genômicas recentes definiram 15 subtipos de LLA-T com padrões de expressão gênica e resultados clínicos distintos, delineados principalmente por essas alterações não codificantes e pelo estágio de diferenciação celular (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024; PÖLÖNEN *et al.*, 2024).

Apesar disso, é conhecido que as LLA-T são impulsionadas por um conjunto de alterações moleculares comuns que determinam o comportamento e a agressividade da doença. O gene *NOTCH1* é um dos oncogenes mais frequentemente alterados, com mutações ativadoras observadas em cerca de 69% dos casos (MANSUR, 2008). Embora as alterações na via NOTCH, família de genes que codifica receptores de sinalização celular, sejam geralmente associadas a um prognóstico favorável, variações específicas, como as mutações intrônicas, podem estar ligadas a resultados clínicos piores (MANSUR, 2008, FERRANDO, 2009).

Outra alteração extremamente comum (71% dos casos) são as deleções nos genes *CDKN2A/B*, que codificam inibidores cruciais do ciclo celular, e cuja inativação funcional resulta na perda da capacidade da célula de interromper seu ciclo de divisão (PERAZZIO, 2022). Em contraste, mutações ou deleções no gene *RUNX1*, fator de transcrição essencial para a regulação da diferenciação dos precursores linfoides, causam o bloqueio do desenvolvimento normal dos timócitos, levando à interrupção da maturação e impedindo que essas células adquiram características funcionais de linfócitos T maduros (SIN; MAN, 2021).

Além disso, a desregulação da via JAK-STAT, que transmite sinais extracelulares ao núcleo para ativar genes específicos, é fundamental, sendo observada em 21% a

25% dos casos de LLA-T (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024). Mutações em receptores como o IL7R podem levar à hiperestimulação dessa via, que é de sobrevivência e crescimento celular, resultando em um sinal incessante para a célula proliferar e sobreviver, o que contribui diretamente para o desenvolvimento e a progressão da leucemia (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024, SIN; MAN, 2021). A ativação da via JAK-STAT é particularmente comum em subtipos de alto risco, como a LLA de Precursor de Células T Precoce (LLA-TPE), e está ligada a um risco mais elevado de Doença Residual Mínima (DRM) após o tratamento inicial, indicando risco aumentado de recidiva (KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Devido a essa prevalência, a via JAK-STAT representa um alvo atraente para inibidores, como o ruxolitinibe, que mostram potencial terapêutico (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024).

Adicionalmente, a LLA-T apresenta caracteristicamente a translocação e a expressão aberrante de oncogenes de fatores de transcrição. Esses rearranjos cromossômicos colocam tais oncogenes sob o controle de intensificadores, ou *enhancers* (que funcionam como potentes elementos reguladores de aumento de transcrição gênica), fortes e específicos de células T, localizados nos loci *TCRB* (7q34) ou *TCRA-TCRD* (14q11). Este fenômeno, conhecido como "sequestro de *enhancer*", resulta na expressão descontrolada de fatores de transcrição em progenitores de células T que, em condições normais, deveriam estar silenciados ou rigorosamente regulados. Esses fatores oncogênicos incluem membros da família *basic helix-loop-helix* (bHLH), como *TAL1*, *TAL2*, *LYL1* e *BHLHB1*; genes de domínio *LIM-only* (*LMO1* e *LMO2*); e genes *homeobox* (HOX) como *TLX1/HOX11*, *TLX3/HOX11L2*, entre outros (VAN VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012). Na prática, esse rearranjo genético altera o "manual de instruções" da célula: ao aproximar um interruptor molecular permanentemente ligado (o *enhancer* do TCR) de genes que comandam a proliferação, a célula interrompe seu processo de maturação e passa a se dividir de forma aberrante. Somado a isso, mecanismos como deleções intracromossômicas (como no caso do *TAL1* em 1p32) ou a ativação constitutiva do receptor *NOTCH1* (*TANI*) reforçam esse estado de "congelamento" em estágios imaturos, conferindo às células T um fenótipo agressivo e persistente (VAN VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012).

Se, por um lado, o cenário molecular revela alvos promissores para o tratamento, a aplicação desses achados na prática clínica ainda enfrenta barreiras importantes. A complexidade genética discutida anteriormente dificulta a ação das

terapias, influenciando o modo como os protocolos atuais tentam lidar com as variações da doença. Por isso, é necessário entender como as estratégias vigentes buscam o controle da LLA-T e quais limitações impedem que o tratamento tenha um sucesso duradouro, motivando, assim, cada vez mais a busca por alternativas seguras e eficazes.

2.1.3. Abordagens Terapêuticas Atuais e Suas Limitações

A LLA-T, especialmente quando a doença se torna recidivada (retorna após o tratamento) ou refratária (não responde ao tratamento), tem um prognóstico desfavorável, com taxas de sobrevida frequentemente abaixo de 25% após terapias agressivas (AMARAL *et al.*, 2025).

O tratamento padrão de primeira linha baseia-se em protocolos de quimioterapia multiagente intensiva, que foram originalmente desenvolvidos para a LLA de células B, mas adaptados com modificações essenciais e específicas para a linhagem T, objetivando uma remissão completa da forma mais precoce, segura e profunda possível (KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Um componente crucial é a L-Asparaginase, uma enzima que destrói o aminoácido L-asparagina, do qual as células leucêmicas dependem para sobreviver (MAESE; RAU, 2022). Sua eficácia é alta, com regimes de quimioterapia intensiva (metotrexato estilo Capizzi) que incluem PEG-Asparaginase, uma formulação que oferece uma depleção de asparagina mais prolongada no soro, resultando em sobrevida livre de doença de até 87% em ensaios clínicos (GÖKBUGET *et al.*, 2024; KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Contudo, seu uso é limitado por toxicidades que exigem monitoramento rigoroso, como toxicidade hepática, pancreatite e problemas de coagulação, especialmente em adultos (GÖKBUGET *et al.*, 2024). Além disso, a resistência ao tratamento é um desafio central, frequentemente causada pelo aumento da produção interna de asparagina pelas próprias células leucêmicas (AMARAL *et al.*, 2025).

Além disso, a quimioterapia intratecal, isto é, administração de quimioterápicos, como Metotrexato (MTX), Citarabina (ARAC) e esteroides diretamente no líquido cefalorraquidiano, é obrigatória para prevenir recaídas no Sistema Nervoso Central, que é um risco maior na LLA-T (KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Complementando esses regimes, a Nelarabina, um pró-fármaco

análogo da desoxiguanosina que demonstra toxicidade seletiva contra linfoblastos T, é a única terapia especificamente aprovada pela FDA para a LLA-T (KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Embora tenha sido aprovada em 2005, inicialmente para pacientes com doença recidivada ou refratária (R/R), ela é cada vez mais incorporada no tratamento de primeira linha da doença (HORMANN; RUDD, 2025).

Para casos de alto risco, o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas Alogênico (allo-HSCT) é a consolidação recomendada (KANTARJIAN; JABBOUR, 2025). Este procedimento consiste em substituir a medula óssea do paciente por células-tronco saudáveis de um doador, mas seu sucesso exige que a DRM, a pequena quantidade de células cancerosas remanescentes, esteja negativa antes do transplante, isto é, a carga tumoral remanescente deve atingir níveis inferiores ao limite de detecção das técnicas laboratoriais de alta sensibilidade antes dessa intervenção (GEORGE; CHAN; RIOS, 2024).

No entanto, a quimioterapia tradicional, além de um percurso clínico extenuante, apresenta altos níveis de toxicidade e se mostra insuficiente para remissões prolongadas (AMARAL *et al.*, 2025). Ainda, para o subtipo de alto risco, LLA de Precursor de Células T Precoce (LLA-TPE), esse protocolo apresenta um prognóstico particularmente desfavorável (SANTOS, 2025). Em resposta a esses desafios da terapia convencional e à necessidade de reduzir a DRM, a terapêutica tem incorporado, de forma crescente, abordagens de medicina de precisão individualizada, focadas em terapias-alvo e imunoterapias que exploram a heterogeneidade genética e as vulnerabilidades moleculares da LLA-T (AMARAL *et al.*, 2025).

Nesse contexto, o campo de maior inovação reside nas Imunoterapias Emergentes, notadamente as terapias com Células T com Receptor de Antígeno Quimérico (*CAR T-cells*) (SANTOS, 2025). Este tratamento consiste na coleta das células T do próprio paciente, que são geneticamente modificadas *in vitro* para expressar um Receptor de Antígeno Quimérico (CAR), permitindo que, após a reinfusão, essas células alteradas reconheçam especificamente e mediem a destruição das células tumorais (RAMPOTAS; RODDIE, 2025). Contudo, o desafio central na LLA-T é a antigenicidade compartilhada, pois as células T cancerosas e as células T normais (necessárias para a imunidade) compartilham marcadores (AMARAL *et al.*, 2025). Essa semelhança pode causar o chamado fratricídio, quando as células CAR-T se atacam e destroem umas às outras, ou aplasia de células T, quando ocorre a

destruição das células T normais do paciente. Embora já existam pesquisas em andamento que utilizam métodos de edição genética, como CRISPR/Cas9 e edição de base, para bloquear a expressão do antígeno alvo nas próprias células CAR-T na busca por contornar esse obstáculo, a terapia ainda deve superar barreiras imunológicas e biológicas distintivas da LLA-T para se consolidar como tratamento padrão de primeira linha ou de salvamento (AMARAL *et al.*, 2025, DOURTHE; BARUCHEL, 2024).

Outras terapias-alvo promissoras incluem inibidores da via JAK-STAT (Ruxolitinibe) e inibidores de BCL-2 (Venetoclax), que bloqueiam vias de crescimento e sobrevivência da célula leucêmica. (AMARAL *et al.*, 2025, GEORGE; CHAN; RIOS, 2024). Também, pesquisas são impulsionada pela detecção de mutações que ativam vias de quinase, o que direciona o uso de Inibidores de Tirosina Quinase como o Dasatinibe (AMARAL *et al.*, 2025). Abordagens adicionais incluem Anticorpos Anti-CD38 (como o Daratumumabe), que obtiveram altas taxas de resposta em LLA-T R/R, e agentes epigenéticos, investigados devido à hipermetilação (uma alteração na regulação da expressão dos genes sem que haja uma mutação na sequência do DNA) característica da doença (AMARAL *et al.*, 2025, GÖKBUGET *et al.*, 2024). Por fim, ferramentas computacionais como a Inteligência Artificial são propostas para acelerar a descoberta e otimizar as estratégias de tratamento da LLA-T (AMARAL *et al.*, 2025).

Entretanto, apesar dos avanços nas terapias-alvo, muitos genes "condutores" (*drivers*) da LLA-T, particularmente os fatores de transcrição desregulados, permanecem difíceis de inibir com pequenas moléculas convencionais (SHARMA *et al.*, 2023). Isso reforça a necessidade de estratégias que atuem diretamente no nível genético. Nesse contexto, a tecnologia de interferência por RNA (RNAi) via siRNA surge como uma ferramenta de alta precisão para o silenciamento desses oncogenes, conforme detalhado a seguir.

2.2. Terapia Alvo com RNA de Interferência (siRNA)

2.2.1. Silenciamento gênico por RNA de Interferência

A tecnologia de Interferência por RNA (RNAi) tem sido amplamente investigada como uma abordagem promissora para o tratamento de leucemias, uma vez que permite a modulação seletiva de alvos genéticos envolvidos na fisiopatologia da doença (LANDRY *et al.*, 2015). O mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNAi, também denominado Silenciamento Gênico Pós-Transcricional (PTGS), constitui um processo regulatório altamente conservado em organismos eucariotos, no qual ocorre a degradação de moléculas de RNA mensageiro de forma dependente da sequência de nucleotídeos (AGRAWAL *et al.*, 2003).

Como ilustrado na Figura 2, o processo inicia-se com a presença de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*), pequenos RNAs de fita dupla em grampo (shRNA, do inglês *short hairpin RNA*) ou microRNAs (miRNA), que são reconhecidos e clivados pela enzima RNase III Dicer em fragmentos menores denominados *small interfering RNAs* (siRNAs), com aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos de comprimento. Esses siRNAs são posteriormente incorporados a um complexo proteico multienzimático conhecido como Complexo Indutor de Silenciamento de RNA (*RNA-Induced Silencing Complex* – RISC). No interior do RISC, a dupla hélice é dissociada, e apenas a fita antissenso (ou fita guia) é retida, servindo como molde para o reconhecimento do RNA mensageiro complementar. O complexo ativado, guiado pela sequência do siRNA, promove a clivagem específica do mRNA alvo, resultando na sua degradação e, conseqüentemente, na inibição da tradução da proteína correspondente (AGRAWAL *et al.*, 2003).

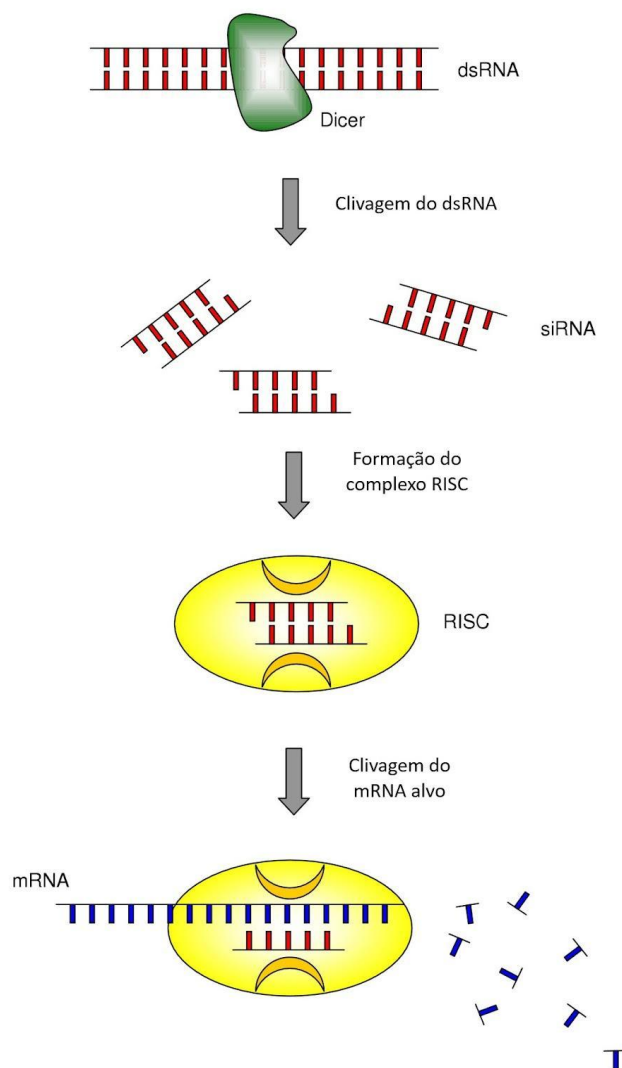


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de interferência por RNA. Adaptado de MOCELLIN e PROVENZANO (2004).

2.2.2. Potencial Terapêutico do RNAi para LLA-T

A tecnologia RNAi tem se consolidado como uma estratégia promissora por possibilitar a modulação precisa de alvos genéticos envolvidos na patogênese da doença (LANDRY *et al.*, 2015). Uma das vantagens desta tecnologia reside em sua alta especificidade molecular, que a estabelece como uma estratégia terapêutica de precisão. Essa especificidade permite o direcionamento seletivo a alvos críticos, como as mutações condutoras (*driver mutations*), que são alterações genéticas frequentemente presentes em todas as células leucêmicas e que, por serem preservadas durante a recidiva, representam alvos ideais para o tratamento (JYOTSANA *et al.*,

2018). Adicionalmente, o RNAi pode ser empregado para silenciar proteínas envolvidas na sobrevivência celular e que se encontram anormalmente superexpressas nas células de LLA-T, um mecanismo que contribui diretamente para a redução da resistência celular e, conseqüentemente, potencializa a eficácia terapêutica (RAMOS *et al.*, 2025).

Embora a maioria dos estudos pioneiros sobre a terapia por RNAi tenha focado na LLA de linhagem B, os princípios terapêuticos observados são plenamente transponíveis à LLA-T. Estratégias de silenciamento gênico inicialmente validadas em LLA-B ou LMC demonstraram eficácia equivalente em linhagens de LLA-T, como Jurkat, MOLT-4 e CCRF-CEM, além de blastos primários de pacientes. Essa eficácia foi comprovada através do uso de siRNA ou shRNA direcionados a genes críticos como *PPP2R5C*, *BCL11B*, *ORP4L*, *IGF2BP2* e nucleostemina (CHEN *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2011; ZHONG *et al.*, 2016).

No entanto, as abordagens experimentais para validar esses alvos variam significativamente em alcance biológico e métodos de entrega, revelando obstáculos críticos para a transposição clínica. Chen *et al.* (2013), por exemplo, demonstraram *in vitro* que o silenciamento do gene *PPP2R5C* inibe a proliferação celular. Contudo, a entrega do siRNA foi realizada via nucleofecção, um método físico de alta toxicidade e inviável para aplicação sistêmica por não oferecer proteção contra a degradação enzimática. De forma semelhante, Huang *et al.* (2011) validaram o gene *BCL11B* como alvo crítico para a sobrevivência da LLA-T, utilizando siRNA para induzir a morte celular em linhagens Molt-4 e blastos primários. Neste caso, o método empregado foi a lipofecção; embora funcional em bancada, essa técnica química carece de estabilidade sistêmica, uma vez que complexos lipídicos convencionais interagem inespecificamente com proteínas plasmáticas e sofrem rápida depuração biológica.

Em um nível superior de complexidade pré-clínica, investigações avançaram para modelos *in vivo*, utilizando estratégias de transdução viral. Feng *et al.* (2022) identificaram a proteína IGF2BP2 como reguladora essencial do oncogene *NOTCH1*, cuja ativação exacerbada é o principal motor patogênico da LLA-T. Utilizando vetores lentivirais para promover um nocaute gênico estável, os autores demonstraram em modelos de xenoenxerto que a ausência desta proteína reduz a carga tumoral e aumenta

a sobrevivência dos animais. Complementarmente, Zhong *et al.* (2016) elucidaram o papel da proteína ORP4L na manutenção do metabolismo energético exacerbado das células malignas. Este alvo apresenta um diferencial terapêutico relevante: sua expressão é exclusiva em células de LLA-T, permanecendo indetectável em linfócitos T saudáveis. O estudo demonstrou que a depleção da ORP4L via shRNA lentiviral impede o desenvolvimento da leucemia em camundongos, resultando na abrogação do crescimento tumoral *in vivo*.

Apesar do sucesso experimental desses estudos, observa-se uma lacuna tecnológica comum: enquanto os métodos físicos e químicos tradicionais restringem-se ao uso laboratorial, os vetores virais, embora eficazes em modelos animais, impõem desafios de segurança e complexidade de produção, além dos altos custos. Assim, a implementação dessas estratégias como terapias clínicas sistêmicas exige o desenvolvimento de carreadores não virais, como os sistemas nanoparticulados, que sejam capazes de proteger o siRNA e direcioná-lo de forma segura e eficaz ao alvo tumoral.

2.2.3. Superação das Barreiras para Aplicação Clínica

Apesar do grande potencial terapêutico dos fármacos baseados em RNAi, como aquelas empregando o siRNA, sua aplicação clínica, especialmente no tratamento da LLA-T, ainda enfrenta desafios significativos relacionados à entrega, estabilidade, toxicidade e especificidade (XIAO *et al.*, 2025). Nesse sentido, uma das principais barreiras é a entrega extra-hepática. Atualmente, os medicamentos de siRNA aprovados pela FDA atuam predominantemente no fígado, constituindo o chamado “efeito de primeira passagem”. O fígado é um órgão que apresenta alto fluxo sanguíneo, função natural de filtração e é facilmente acessado por tecnologias de entrega já consolidadas, capazes de direcionar o fármaco especificamente aos hepatócitos (XIAO *et al.*, 2025). Entretanto, a entrega de siRNAs a outros tecidos, como as células leucêmicas da medula óssea e do sangue, necessária para o tratamento da LLA-T, é um processo muito mais complexo e continua sendo um dos maiores obstáculos tecnológicos ao avanço das terapias baseadas em RNAi (GARBAYO *et al.*, 2024). Além da complexidade de entrega, a implementação de estratégias de direcionamento ativo é essencial para garantir que o siRNA alcance de forma precisa as células cancerosas, como os linfócitos T malignos (GARBAYO *et al.*, 2024).

Outro desafio importante está relacionado à estabilidade do fármaco. O siRNA livre, sem proteção ou transportador, é rapidamente degradado por nucleases séricas e filtrado pelos rins devido ao seu pequeno tamanho, resultando em curta meia-vida no organismo (XIAO *et al.*, 2025). Além disso, o siRNA desprotegido em circulação pode ativar o sistema imune inato, desencadeando respostas imunológicas indesejadas (XIAO *et al.*, 2025).

Outro ponto crítico é a ocorrência de efeitos fora do alvo (*off-target effects*). Embora o siRNA seja projetado para apresentar alta especificidade, ele pode silenciar transcritos não intencionais, o que pode levar à toxicidade celular e representar um importante obstáculo ao progresso clínico (PECOT *et al.*, 2011). Esse efeito ocorre devido à hibridização cruzada entre o siRNA e transcritos que compartilham apenas similaridade parcial de sequência, de maneira análoga ao mecanismo de ação dos microRNAs (miRNAs).

Dessa forma, torna-se necessária a adoção de estratégias de entrega capazes de superar as principais barreiras associadas à terapia com RNAi, proporcionando proteção contra a degradação, maior estabilidade em circulação, redução da toxicidade e entrega direcionada às células leucêmicas, ampliando, assim, o potencial de aplicação clínica dessa abordagem terapêutica.

2.3. Nanopartículas como Sistemas de Entrega para siRNA

2.3.1. O Papel dos Vetores na Superação das Barreiras Biológicas

Conforme discutido, a técnica de RNAi via silenciamento por siRNA, apesar de seu imenso potencial para o tratamento de doenças como a leucemia, enfrenta desafios significativos. Nesse sentido, a baixa eficiência na entrega e a dificuldade de administrar o material genético sistemicamente às células doentes no corpo humano limitam drasticamente sua eficácia terapêutica (BANOON *et al.*, 2024). Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas de entrega, ou vetores, se faz necessário. Para que um sistema de entrega seja considerado ideal e eficaz, ele deve cumprir uma série de requisitos rigorosos destinados a superar barreiras biológicas e a garantir a segurança do paciente. Em termos de segurança, o vetor ideal deve possuir baixa

toxicidade, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e ser não-imunogênico (HAMIMED; JABBERI; CHATTI, 2022; JIANG *et al.*, 2023a; PARASHAR *et al.*, 2025). Ademais, ele precisa garantir a sobrevivência sistêmica: o carreador deve proteger a carga terapêutica da degradação por nucleases e, ao mesmo tempo, evitar os mecanismos de depuração rápida do organismo (JIANG *et al.*, 2023a). Isso inclui escapar tanto da filtração renal, que elimina partículas pequenas (inferiores a aproximadamente 6 nm, independente da carga), quanto da opsonização seguida de captura pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), que remove partículas grandes (superiores a 100 nm), preferencialmente as com carga positiva (SINANI *et al.*, 2023)

Para que o nano-vetor seja eficaz, ele deve apresentar boa funcionalidade no local de ação, o que inclui ser internalizado pela célula-alvo de forma eficiente. Essa etapa depende de suas características físico-químicas, como tamanho, forma e carga, que influenciam as vias de endocitose, principal mecanismo de entrada celular (SINANI *et al.*, 2023). O tamanho das nanopartículas é determinante nesse processo: partículas menores que 60 nm geralmente favorecem a via mediada por caveolina, uma proteína de membrana que forma pequenas invaginações conhecidas como cavéolas, responsáveis por um tipo de endocitose que evita a passagem pelo lisossomo e preserva a integridade da carga terapêutica (SINANI *et al.*, 2023). Em tumores líquidos, a especificidade é aprimorada pelo direcionamento ativo, obtido por meio da funcionalização da superfície da nanopartícula com ligantes específicos, como aptâmeros Sgc8 e ácido hialurônico, que reconhecem receptores como PTK7 e CD44 nas células leucêmicas (QIAN *et al.*, 2024; SINANI *et al.*, 2023). E por fim, um tamanho controlado contribui para manter a nanopartícula em circulação por tempo suficiente para que esses ligantes se liguem de forma eficiente ao alvo.

Após a internalização, é essencial que o sistema favoreça o escape endossomal, evitando a degradação lisossomal da carga terapêutica. Além disso, o direcionamento seletivo e a liberação controlada, de preferência responsiva a estímulos, são fundamentais para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade (ZHANG; LIANG; MA, 2021; WANG *et al.*, 2025; PARASHAR *et al.*, 2025).

Uma estratégia primária e intuitiva consiste no uso de vetores catiônicos, que interagem eletrostaticamente com o siRNA de carga negativa, formando um complexo com carga final positiva que facilita a adsorção na superfície celular e a subsequente

internalização (PACK; HOFFMAN; PUN; STAYTON, 2005). Contudo, essa abordagem introduz um dos dilemas centrais no desenvolvimento de nanovetores: a citotoxicidade associada à carga catiônica. Está bem documentado na literatura que polímeros com alta densidade de carga positiva, como a polietilenimina (PEI) de alto peso molecular, podem desestabilizar as membranas celulares de forma não específica, levando à lise celular, indução de apoptose e ativação de respostas inflamatórias (LYU *et al.*, 2024; MOLLÉ *et al.*, 2022). Este fenômeno, por vezes chamado de "paradoxo catiônico", evidencia que a mesma propriedade que confere alta eficiência de transfecção é também a principal fonte de toxicidade (MITCHELL *et al.*, 2021). Portanto, o grande desafio de engenharia de um nanocarreador reside em alcançar um equilíbrio preciso entre eficácia e segurança (LYU *et al.*, 2024).

Uma vez estabelecidos os requisitos ideais para um nanovetor, torna-se necessário examinar como as tecnologias disponíveis se posicionam diante de tais exigências. Nessa perspectiva, a engenharia de biomateriais buscou inspiração tanto em mecanismos biológicos naturais quanto em sínteses químicas avançadas, resultando em um cenário tecnológico diversificado. O atual estado da arte em sistemas de entrega reflete, portanto, um esforço contínuo para mimetizar a alta eficiência de invasão viral, enquanto se aprimora a segurança e a versatilidade dos materiais sintéticos.

2.3.2. Estado da Arte: Vetores Virais e Não Virais

O estado da arte em sistemas de entrega para terapia gênica é amplamente classificado em duas categorias principais: vetores virais e não virais. Os vetores virais utilizam partes de vírus modificadas para introduzir um gene de interesse no genoma da célula e são historicamente reconhecidos por sua alta eficiência, que em alguns estudos pode atingir 90% de transfecção, e por resultar em um tempo de expressão do gene mais longo e estável (BANOON *et al.*, 2024; JIANG *et al.*, 2023a). Por esses motivos, dominaram o cenário da pesquisa, respondendo por cerca de 70% dos ensaios clínicos até 2017 (JIANG *et al.*, 2023a). Diversos tipos de vetores virais são utilizados, cada um com características específicas. O Adenovírus (AdV), por exemplo, é capaz de transportar uma grande quantidade de DNA, embora a expressão gênica seja temporária e sua imunogenicidade, alta (BULCHA *et al.*, 2021). Um marco na terapia gênica, o Gendicine[®], primeiro medicamento do gênero comercializado no mundo,

utiliza um vetor de adenovírus para expressar o gene supressor de tumor p53 (MENDES *et al.*, 2022).

Os Retrovírus (RV) e Lentivírus (LV) destacam-se pela capacidade de integração ao genoma do hospedeiro, proporcionando expressão gênica de longo prazo, sendo que os LV podem infectar tanto células em divisão quanto quiescentes (JIANG *et al.*, 2023a). Essa tecnologia revolucionou a terapia baseada em células CAR-T, culminando na aprovação do Kymriah[®] (tisagenlecleucel) para o tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (GINN *et al.*, 2018). Já os Vírus Adeno-Associados (AAV), apesar da menor capacidade de carga, são considerados menos imunogênicos quando comparados ao RV e ao LV, estão no centro de sucessos regulatórios recentes, como o Luxturna[®], para uma forma de cegueira hereditária, e o Zolgensma[®], para atrofia muscular espinhal (MENDES *et al.*, 2022). Contudo, atrelada a essa metodologia também existem desvantagens significativas, como o potencial de desencadear, ainda sim, uma resposta imune, riscos de segurança como a oncogênese por inserção, e a dificuldade de produção em larga escala devido ao alto custo, uma vez que se trata de partículas virais (RILEY; VERMERRIS, 2017; BANOON *et al.*, 2024).

Em contrapartida, os vetores não virais surgiram como uma classe promissora para contornar os problemas dos vetores virais. Eles se destacam por oferecerem um perfil de segurança superior, com baixa citotoxicidade e resposta imune diminuída, além de um processo de produção de baixo custo e fácil escalabilidade (PARASHAR *et al.*, 2025; YU *et al.*, 2021). A classe de vetores não virais é bastante ampla, englobando nanopartículas inorgânicas e orgânicas. Os nanomateriais inorgânicos são procurados por sua facilidade de funcionalização e propriedades únicas. As nanopartículas de ouro (AuNPs), por exemplo, são usadas em abordagens combinadas de quimio e fototermoterapia para superar a resistência a múltiplos fármacos (WANG *et al.*, 2025). As nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs) são empregadas em sistemas teranósticos, que integram diagnóstico por imagem de ressonância magnética (MRI) com a entrega de cargas terapêuticas como o siRNA (RILEY; VERMERRIS, 2017). Já as nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) se destacam como plataformas versáteis devido aos seus poros ajustáveis, que permitem o encapsulamento de diferentes ácidos nucleicos (DE CROZALS *et al.*, 2016).

As nanopartículas orgânicas, por sua vez, são valorizadas por sua excelente biocompatibilidade e capacidade de encapsular ácidos nucleicos. Dentro dessa categoria, estão os sistemas de entrega baseados em lipídios, como os lipossomos e as nanopartículas lipídicas (LNPs). Sua composição, que inclui fosfolipídeos, colesterol e polietilenoglicol (PEG), confere-lhes estabilidade e a capacidade de se fundirem com membranas celulares, facilitando a entrega do material genético (MENDES *et al.*, 2022). A eficácia dessa abordagem foi consolidada globalmente com o sucesso das vacinas de mRNA contra a SARS-CoV-2 (BNT162b2 e mRNA-1273) e com a aprovação de medicamentos como o Onpatro®, uma LNP carreadora de siRNA (AKINC *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2022).

As nanopartículas poliméricas também são extensivamente apreciadas por sua funcionalidade de superfície flexível e biodegradabilidade ajustável (ISLAM *et al.*, 2025). Essa categoria inclui polímeros naturais, como a quitosana, não-tóxica e com alta densidade de carga, e as ciclodextrinas (CDs), que formam complexos de inclusão com compostos lipofílicos (PARASHAR *et al.*, 2025; RILEY; VERMERRIS, 2017). Os polímeros sintéticos, no entanto, oferecem maior versatilidade, permitindo o ajuste preciso de propriedades como biodegradabilidade e carga (PARASHAR *et al.*, 2025). Polímeros catiônicos como a polietilenimina (PEI), dendrímeros de Poli(amidoamina) (PAMAM) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), este último aprovado pela FDA, são exemplos proeminentes (MOLLÉ *et al.*, 2022; FANA *et al.*, 2020). Embora a citotoxicidade inerente a esses polímeros catiônicos seja um desafio conhecido, como discutido anteriormente, ela tem impulsionado a pesquisa no desenvolvimento de polímeros modificados ou com densidades de carga mais baixas, visando aprimorar a segurança (MOLLÉ *et al.*, 2022). Ainda a combinação de diferentes blocos poliméricos, como o Polietilenoglicol (PEG) e a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL), tem levado à criação de nanossistemas complexos, como micelas e polimerossomos, que prolongam a circulação sanguínea e permitem uma liberação controlada, demonstrando a vasta gama de arquiteturas possíveis para essa classe de carreadores (DHIMAN *et al.*, 2025; PARASHAR *et al.*, 2025).

A diversidade de vetores não virais reflete a busca contínua por plataformas que conciliem a proteção da carga terapêutica com a versatilidade de modificação superficial. Dentre as arquiteturas orgânicas mencionadas, os copolímeros em bloco têm ganhado destaque por permitirem a engenharia de nanoestruturas que respondem

precisamente aos desafios da circulação sistêmica e da entrega intracelular. Nesse cenário, as micelas poliméricas emergem como uma solução estratégica, unindo a estabilidade estrutural de núcleos hidrofóbicos à funcionalidade de coroas hidrofílicas. A seguir, detalha-se a plataforma central deste estudo: as micelas de PEG-PCL-Maleimida, explorando como sua composição química e capacidade de funcionalização a posicionam como uma ferramenta de alta performance para a terapia gênica em oncologia.

2.3.3 .Micelas de PEG-PCL

Dentre as diversas plataformas de nanopartículas poliméricas, as micelas destacam-se como uma das mais promissoras devido à sua estrutura auto-organizada e às propriedades físico-químicas favoráveis à entrega de fármacos. Elas são formadas pela auto agregação espontânea de copolímeros em blocos anfifílicos em meio aquoso, resultando em uma configuração de núcleo-casca (BABANYINAH *et al.*, 2024; SINHA *et al.*, 2024). Nessa estrutura, o núcleo hidrofóbico, geralmente composto por polímeros como a PCL, atua encapsulando e solubilizando compostos hidrofóbicos, enquanto a coroa hidrofílica, formada tipicamente por PEG, estende-se para o meio aquoso, protegendo o núcleo e conferindo estabilidade coloidal à nanoestrutura (ALAMI-MILANI *et al.*, 2018).

O copolímero PEG-PCL-Maleimida (PEG-PCL-Mal) representa uma variação amplamente empregada desse sistema, reunindo biocompatibilidade, estabilidade e potencial de funcionalização superficial. O bloco hidrofóbico de PCL forma o núcleo da micela, promovendo a encapsulação de fármacos e liberação controlada, além de conferir biodegradabilidade e sustentação estrutural (BABANYINAH *et al.*, 2024; SINANI *et al.*, 2023). Já o PEG, constituinte da coroa hidrofílica, atua como uma barreira protetora, garantindo estabilidade em meio biológico e prolongando o tempo de circulação sistêmica por meio do chamado efeito *stealth*, que reduz a opsonização e a eliminação pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SINHA *et al.*, 2024; SALAMA *et al.*, 2023). A escolha das micelas poliméricas como sistemas de liberação de fármacos em aplicações oncológicas baseia-se em um conjunto de vantagens estruturais e funcionais. Uma característica central é a alta estabilidade termodinâmica,

expressa pela Concentração Micelar Crítica (CMC), ou seja, a menor concentração de copolímero necessária para a formação espontânea das micelas. Valores baixos de CMC indicam maior resistência à diluição, fator essencial para que a micela mantenha sua integridade na corrente sanguínea e evite a liberação prematura da carga terapêutica, o que reduziria a eficácia e aumentaria a toxicidade (BABANYINAH *et al.*, 2024). Micelas à base de PCL apresentam CMC na ordem de $1,10 \times 10^{-5}$ mg/mL, evidenciando estabilidade adequada para circulação sistêmica (ALAMI-MILANI *et al.*, 2018; BABANYINAH *et al.*, 2024).

O tamanho das micelas é outro parâmetro determinante para o sucesso terapêutico. Copolímeros como o PEG-PCL formam estruturas esféricas com diâmetro hidrodinâmico entre 10 e 100 nm, faixa que oferece vantagens críticas para a biodistribuição, tempo de circulação e captação celular (SINHA *et al.*, 2024). Partículas menores que 5–6 nm são rapidamente filtradas pelos rins, apresentando baixa retenção plasmática e, conseqüentemente, menor eficácia terapêutica (GROSSEN *et al.*, 2017). Por outro lado, manter as micelas na faixa de 10 a 200 nm permite evitar a excreção renal, enquanto partículas maiores que 500 nm ou com carga superficial positiva são prontamente reconhecidas e removidas pelo SFM (GROSSEN *et al.*, 2017). Assim, um tamanho nanométrico controlado, aliado a uma superfície neutra ou ligeiramente negativa, é essencial para prolongar a circulação sistêmica e evitar a depuração fagocitária.

A evasão bem-sucedida dos mecanismos de *clearance* resulta em maior meia-vida plasmática, fator essencial para que as micelas interajam com células leucêmicas circulantes ou localizadas na medula óssea. Esse efeito é potencializado pela PEGuilação, que reduz a imunogenicidade e prolonga a estabilidade em circulação, aumentando a probabilidade de o nanocarreador alcançar o alvo terapêutico (SINHA *et al.*, 2024; SALAMA *et al.*, 2023).

Por fim, o tamanho controlado das micelas, geralmente entre 10 e 100 nm, contribui não apenas para a estabilidade e a circulação prolongada, mas também para a otimização da endocitose mediada por caveolina, predominante em partículas menores que 60 nm. Essa via de internalização permite o escape endossomal e evita a degradação lisossomal, etapas essenciais para que o siRNA alcance o citosol e

promova a ativação do complexo RISC, responsável pelo silenciamento gênico (KAPSE *et al.*, 2020).

A inserção de um grupo maleimida na extremidade do PEG oferece reatividade química específica, possibilitando a funcionalização da superfície da micela por meio da química tiol-maleimida, que permite a conjugação seletiva de biomoléculas contendo grupos tiol, como aptâmeros, peptídeos ou nanocorpos, ampliando o potencial de direcionamento ativo e de liberação controlada da carga terapêutica (QIAN *et al.*, 2024; ZHANG; LIANG; MA, 2021).

Além disso, a funcionalização ativa da superfície com ligantes específicos, como aptâmeros Sgc8 (alvo PTK7) e ácido hialurônico (alvo CD44), confere seletividade aumentada de 5 a 10 vezes em linhagens LLA-T (Jurkat e MOLT-4), promovendo internalização mediada por receptor e reduzindo significativamente os efeitos *off-target* em células normais (VARELA-MOREIRA *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2024).

Dessa forma, a consolidação da micela de PEG-PCL-Mal como suporte estrutural abre caminho para a aplicação de métodos de funcionalização que operam em escala molecular. Nesse sentido, a organização do nanovetor pode ser refinada através da deposição alternada de componentes, utilizando a superfície micelar como um molde para a construção de arquiteturas multicamadas. Essa estratégia, baseada na atração eletrostática entre polieletrólitos de cargas opostas, permite a incorporação ordenada do siRNA e de polímeros funcionais, garantindo que cada interface da partícula desempenhe um papel específico na proteção e no direcionamento da carga terapêutica.

2.3.4. A Estratégia de Montagem *Layer-by-Layer* para Complexação do siRNA

A técnica de montagem *Layer-by-Layer* (LbL) representa uma abordagem versátil e eficiente para a entrega de siRNA, permitindo o controle preciso da estrutura, composição e funcionalidade superficial das nanopartículas. O método baseia-se na deposição eletrostática alternada de camadas de polycations e polianions, explorando as interações de carga entre os componentes (LEE *et al.*, 2023). Como os ácidos nucleicos, incluindo o siRNA, apresentam carga negativa devido aos grupos fosfato

em sua estrutura, eles podem ser complexados com polímeros catiônicos ou com grupos amina carregados positivamente presentes nas extremidades dos copolímeros, formando camadas estáveis e compactas (LEE *et al.*, 2023).

O processo de montagem ocorre de forma sequencial, iniciando-se pela formação de um núcleo (*core*), que pode consistir em uma micela polimérica carregada positivamente ou funcionalizada com terminais catiônico, sendo esse último o caso de micelas PEG-PCL-Mal, conferindo-lhe a carga necessária para a deposição da camada seguinte (PASSOS GIBSON *et al.*, 2023). Ainda, como uma etapa extra, pode-se aplicar uma primeira camada de um material catiônico, como descrito por Ki Young Choi *et al.* (2019), a fim de promover a atração eletrostática subsequente com o ácido nucleico. Em seguida, o siRNA, devido à sua carga negativa, é adsorvido sobre o núcleo por interações eletrostáticas, formando uma camada estável. Uma vez que as camadas de carregamento da partícula sejam montadas, pode-se iniciar a complexação com materiais para as camadas mais externas, que, em geral, agem como camada protetora e de direcionamento nesses vetores, uma vez que eles sejam inseridos em circulação. É importante ressaltar que a seleção dos materiais que compõem as camadas da nanopartícula é um fator crítico, devendo considerar não apenas a eficiência de complexação, mas também a biocompatibilidade e a segurança biológica dos polímeros empregados (LEE *et al.*, 2023).

A confirmação da adição de cada nova camada é realizada por meio da medição do potencial zeta, que revela uma inversão de carga, indicando a modificação bem-sucedida da superfície, além do monitoramento do diâmetro hidrodinâmico por DLS (*Dynamic Light Scattering*), que permite acompanhar o crescimento progressivo das camadas (PASSOS GIBSON *et al.*, 2023; CHOI *et al.*, 2019). Esse processo pode ser repetido ciclicamente, possibilitando a incorporação de múltiplas camadas de siRNA e o ajuste fino das propriedades físico-químicas e superficiais da nanopartícula.

A montagem LbL apresenta um conjunto de características que a tornam particularmente atrativa para a entrega controlada de siRNA. Entre elas, destaca-se a capacidade de proteger o material genético da degradação enzimática, prolongando sua estabilidade em meio biológico e meia-vida plasmática. Estudos relatam que nanopartículas LbL contendo siRNA apresentaram meia-vida de até 65 horas, em contraste com os poucos minutos observados para o siRNA livre (CHOI *et al.*, 2019).

Além disso, a estrutura multicamada permite aumentar o carregamento de siRNA por repetição das etapas de deposição, possibilitando um controle refinado da dose terapêutica sem alterações consideráveis no tamanho global da nanopartícula (LEE *et al.*, 2023; SHAABANI *et al.*, 2021).

Outro aspecto importante refere-se à eficiência de transfecção conferida pelos polímeros catiônicos utilizados em algumas das camadas da nanopartícula, como o poli(L-arginina) (PLA). O PLA, além de ser um polieletrólito biodegradável, apresenta propriedades tamponantes e capacidade de ionização, características que favorecem o escape endossomal, que como mencionado anteriormente consiste em uma etapa essencial para a liberação do siRNA no citoplasma e subsequente ativação do complexo RISC, responsável pelo silenciamento gênico (LEE *et al.*, 2023; HASHIMOTO *et al.*, 2012).

A natureza modular do método LbL possibilita a introdução de funcionalizações adicionais voltadas à otimização da estabilidade, biocompatibilidade e seletividade celular das nanopartículas. O ácido hialurônico (HA) destaca-se como uma das camadas externas mais utilizadas, uma vez que sua carga negativa atua na neutralização do potencial citotóxico dos polímeros internos e contribui para a proteção física do complexo de siRNA, reduzindo a degradação e aumentando a biocompatibilidade geral do sistema. Paralelamente, o HA confere à nanopartícula uma capacidade de reconhecimento ativo por meio da interação com receptores CD44, amplamente expressos em células leucêmicas, favorecendo a captação seletiva e mediada por receptor (LUO *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2024).

Adicionalmente, as camadas externas podem ser modificadas com ligantes de alta afinidade, como aptâmeros Sgc8, que reconhecem o receptor PTK7, expresso em uma grande fração dos casos de leucemia, ou com ácido hialurônico e/ou anticorpos voltados para receptores como CD44 ou CD20, possibilitando estratégias de direcionamento simples ou duplo que já demonstraram eficácia em modelos pré-clínicos de cânceres hematológicos (CHOI *et al.*, 2019; WANG; KIM; LEE, 2022; ZHANG *et al.*, 2021). Essa combinação de revestimento protetor e reconhecimento ativo aumenta a especificidade de ligação, melhora a eficiência de internalização via endocitose mediada por receptor e tende a reduzir significativamente os efeitos

off-target em células não malignas (AL JAYOUSH *et al.*, 2025; WANG *et al.*, 2025; ZENG *et al.*, 2024).

Desse modo, o método LbL permite que o siRNA seja compactado em múltiplas camadas protetoras, conferindo estabilidade, controle de liberação e seletividade aumentada. Essa arquitetura modular possibilita o desenvolvimento de nanocarreadores “inteligentes”, capazes de responder a estímulos fisiológicos, promover liberação controlada da carga terapêutica e atingir células-alvo com alta precisão. Dessa forma, a montagem LbL combina as vantagens dos sistemas poliméricos não virais com a capacidade de entrega localizada e ajustável, configurando uma estratégia promissora e robusta para a terapia gênica baseada em siRNA, com potencial aplicação em modelos de LLA-T

Nesse contexto, propõe-se uma plataforma nanocarreadora utilizando a técnica LbL para organizar hierarquicamente o núcleo de PEG-PCL-Mal/siRNA e as camadas de PLA e HA (Figura 1, seção 1.2.1), configuração esta, que busca criar um desenho ajustado a interface entre o nanovetor e as células leucêmicas, equilibrando estabilidade coloidal e eficiência de internalização.

CAPÍTULO III: Metodologia

3.1. Materiais e reagentes

Para a realização dos experimentos, foram utilizados: copolímero PEG-PCL-Maleimida (maleimida-poli(etilenoglicol)-b-poli(ϵ -caprolactona) PM médio do PEG $\approx 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; PM médio do PCL $\approx 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), adquirido da Sigma-Aldrich (Estados Unidos, código 902381), acetona P.A., álcool polivinílico (PVA) e Poloxamer 407 (P407) como surfactantes. O material genético utilizado como modelo de adsorção foi o RNA de levedura (Roche[®], purificado de *Saccharomyces cerevisiae*, em pó liofilizado, código 10109223001), enquanto os ensaios de internalização celular empregaram siRNA HSP90AB1, 119758 (Invitrogen, Thermo Fisher), marcado com FAM[™] (*Fluorescein Labeling Reagent*) de acordo com as instruções do Silencer[™] siRNA Labeling Kit (Invitrogen). Os ensaios de transfecção foram realizadas utilizando o reagente Lipofectamine[™] RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), como controle positivo, seguindo as orientações do fabricante para sistemas de transfecção em suspensão. Para o recobrimento multicamada, utilizaram-se os polieletrólitos poli(L-arginina) (PLA) (cloridrato de homopolímero de L-arginina; MM 15.000–70.000 Da; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e ácido hialurônico (HA) (polissacarídeo glicosaminoglicano de origem bacteriana; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os meios de cultura e suplementos incluíram meio RPMI 1640 (Thermo Fisher), soro fetal bovino (SFB), tampão TAE 1x, agarose (Sigma-Aldrich), brometo de etídio, marcador de DNA (100 pb) (PROMEGA), meio Opti-MEM (Thermo Fisher) e água livre de nucleases (Invitrogen).

3.2. Síntese e Caracterização das Nanopartículas Poliméricas

3.2.1. Protocolo de Síntese das NPs por nanoprecipitação

A nanoprecipitação é um método amplamente empregado na produção de nanopartículas, especialmente em aplicações de liberação controlada de fármacos e ciência dos materiais. Suas principais vantagens incluem a simplicidade e rapidez do processo, que requer poucos equipamentos e etapas operacionais, além da alta

reprodutibilidade e facilidade de escalonamento para a produção em maior escala. Trata-se de uma técnica versátil, compatível com diferentes polímeros e compostos bioativos, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos (MARTÍNEZ RIVAS *et al.*, 2017), e que se destaca por ser econômica e ambientalmente favorável, devido ao baixo consumo energético e à ausência de etapas complexas de purificação (BARRERAS-URBINA *et al.*, 2016).

A produção da emulsão por nanoprecipitação iniciou-se com a preparação individual das fases aquosa e orgânica. A fase orgânica foi composta por acetona P.A., utilizada como solvente, contendo o copolímero PEG-PCL-Mal, responsável pela formação das nanopartículas. A fase aquosa foi constituída por soluções a 1% (m/v) de agentes tensoativos, sendo avaliados comparativamente o álcool polivinílico (PVA) e o Poloxamer 407 (P407). As concentrações dos surfactantes foram definidas com base em estudos prévios do grupo, nos quais essas condições demonstraram ser ideais para essa aplicação. Nos ensaios envolvendo siRNA, toda a manipulação foi realizada com água livre de RNase (*RNase-free*), de modo a preservar a integridade das moléculas.

Para o preparo da fase orgânica, 1000 μ L de acetona foram adicionados à massa previamente pesada do copolímero, quantidade calculada para obter uma concentração ao final de polímero precipitado de 1 mg/mL, até completa solubilização. Em seguida, essa solução foi adicionada à fase aquosa contendo o surfactante, na proporção de 200 μ L de fase orgânica para cada 1 mL de fase aquosa. Após a mistura, a suspensão resultante foi mantida sob agitação magnética constante até a completa evaporação do solvente orgânico, promovendo a formação estrutural das nanopartículas. A suspensão aquosa remanescente foi então armazenada sob refrigeração a 4°C até a realização dos ensaios subsequentes.

3.2.2. Tamanho e Polidispersão

Para verificar se as partículas produzidas apresentavam tamanho adequado para a aplicação desejada, ou seja, inferior a 100 nanômetros, e se permaneciam em suspensão estável, foram realizadas análises de tamanho de partícula e polidispersão utilizando o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar). Desse modo, foi utilizado o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Conforme mencionado, o tamanho das nanopartículas é um requisito crucial para a aplicação em questão, sendo ideal que o diâmetro hidrodinâmico seja inferior a 100 nm. Para o acompanhamento do tamanho das partículas precipitadas, a técnica de DLS foi empregada. Assumindo um modelo de esfera difusa, a DLS funciona da seguinte maneira: um feixe de laser ilumina a amostra, e as partículas em movimento browniano espalham a luz. Um detector registra as flutuações na intensidade da luz espalhada ao longo do tempo, que são analisadas por uma função de autocorrelação. Partículas menores se movem mais rápido, gerando flutuações rápidas, enquanto partículas maiores se movem mais devagar. A partir dessas informações, calcula-se o coeficiente de difusão e, pela equação de Stokes-Einstein (Equação 1), determina-se o tamanho hidrodinâmico das partículas.

$$D = \frac{K_B * T}{6 * \pi * R_H * \eta}$$

Equação 1 – Equação de Stokes-Einstein, utilizada pelo equipamento para determinar o diâmetro das nanopartículas produzidas. K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, π é o número pi, enquanto R_H é o raio hidrodinâmico e η é a viscosidade.

A viscosidade, índice de refração do dispersante e constante dielétrica foram considerados para a água (0,887 cP; 1,33; 78,5, respectivamente), uma vez que as NPs diluída em um meio aquoso.

Para essa análise, a amostra resultante da síntese das NPs foi diluída para obter uma concentração de NPs de cerca de 1 mg/mL em um volume final de 1 mL. Como um tratamento pós-síntese para garantir a pureza da amostra, foi feita uma filtração com filtro de seringa de polietersulfona (PES) de 0,22 micrômetros e a amostra foi então transferida para a cubeta adequada para a leitura do equipamento. Uma análise subsequente confirmou que a filtração não resultou em retenção significativa do material.

Além disso, foi realizado um acompanhamento da estabilidade das nanopartículas por meio de novos ensaios realizados 60 dias após a síntese. A estabilidade da suspensão é indicada principalmente pela ausência de formação de aglomerados e pela manutenção dos valores de tamanho próximos aos obtidos imediatamente após a síntese

3.2.3. Potencial Zeta e Ponto Isoelétrico (pI)

Para avaliar a estabilidade coloidal e o potencial eletrocinético das nanopartículas, foi realizada a análise do potencial zeta por meio da técnica de Eletroforese por Espalhamento de Luz (ELS) no equipamento Litesizer 500 (Anton Paar).

A estabilidade coloidal foi avaliada pela análise do potencial zeta por meio da técnica de ELS. O potencial zeta é o potencial elétrico medido no plano de cisalhamento de uma superfície carregada e está diretamente relacionado à estabilidade de dispersões coloidais. Sua determinação é realizada em uma cubeta contendo dois eletrodos de ouro. A aplicação de uma voltagem entre os eletrodos gera um campo elétrico que induz o movimento das partículas carregadas em direção ao eletrodo de carga oposta, um fenômeno conhecido como mobilidade eletroforética. Um feixe de laser é direcionado para a cubeta, e o espalhamento da luz é utilizado para monitorar a velocidade de deslocamento das partículas. Essa velocidade é proporcional à voltagem aplicada, e a partir da análise desses dados é possível calcular o potencial zeta com base na equação de Henri (Equação 2), que relaciona a mobilidade eletroforética à viscosidade e à constante dielétrica do meio dispersante (SELVAMANI, 2018).

$$U_e = \frac{2 * \epsilon * z * f(k\alpha)}{3\eta}$$

Equação 2 – Equação conhecida como equação de Henri, sendo empregada no equipamento para determinação do potencial zeta, sendo U_e correspondente à mobilidade eletroforética, z é o potencial zeta, ϵ é a constante dielétrica e η a viscosidade do líquido dispersante, enquanto $f(k\alpha)$ é a função de Henri.

Valores absolutos elevados de potencial zeta indicam uma menor tendência à aglomeração de partículas, refletindo maior estabilidade da suspensão (CLOGSTON; PATRI, 2011; GHERNAOUT, 2015).

A preparação das amostras para a leitura do potencial zeta foi realizada seguindo o mesmo protocolo da seção de análise de tamanho das nanopartículas, com a única diferença sendo a utilização de uma cubeta específica para a medição do potencial eletrocinético, que contém dois eletrodos de ouro. Para monitorar o comportamento do sistema ao longo do tempo, foram realizados novos ensaios 60 dias

após a síntese verificando a manutenção do potencial zeta original sob armazenamento.

Como uma extensão da análise de potencial zeta, a determinação do ponto isoelétrico (pI), ou seja, o pH no qual o potencial líquido das nanopartículas é zero, foi realizada de maneira análoga. O ensaio consistiu em preparar soluções em uma faixa de pH de 2 a 8, utilizando-se água ultrapura e o ajuste feito com adição de ácido (ácido clorídrico) ou base (hidróxido de sódio) monitorando-se com pHmetro. Em seguida, as nanopartículas foram dispersas nessas soluções. Então, a leitura do potencial zeta de cada amostra foi executada no equipamento Litesizer 500 (Anton Paar).

3.2.4. Esterilidade

A avaliação da esterilidade das nanopartículas de PEG-PCL-Mal foi realizada por meio de ensaios de incubação com meio de cultura, com o objetivo de verificar a necessidade de manipulação em ambiente estéril durante a etapa de síntese. Para isso, o processo de nanoprecipitação foi conduzido sob duas condições experimentais distintas: parte das amostras foi produzida em bancada aberta, e outra parte, sob fluxo laminar, garantindo um ambiente estéril. Essa comparação visou determinar se o controle ambiental durante a síntese constitui um fator crítico para a integridade biológica do sistema antes das etapas subsequentes de aplicação celular.

Após a síntese, uma fração das formulações obtidas em ambas as condições de produção foi submetida à esterilização por filtração física, utilizando filtros de seringa de PES com poros de 0,22 μm , a fim de avaliar a necessidade desse pós-tratamento complementar para assegurar a esterilidade final. As amostras resultantes foram distribuídas em placas de 24 poços, contendo meio RPMI 1640, suplementado ou não com 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo essas as mesmas condições empregadas na manutenção das linhagens Jurkat e MOLT-4. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por sete dias. A eficácia da filtração e a influência das condições de produção (bancada aberta *versus* fluxo laminar) foram monitoradas por inspeção visual após o período de incubação e por microscopia óptica de luz transmitida, permitindo avaliar a presença de turbidez e crescimento microbiano, respectivamente.

3.3. Ensaio de Adsorção de RNA

3.3.1. Eficiência de Adsorção

Neste estudo, utilizou-se o RNA de levedura como molécula análoga para mimetizar o comportamento de adsorção do siRNA. O processo de complexação NP-RNA fundamentou-se na adsorção física superficial, realizada mediante a incubação de ambas as estruturas em microtubos. Para investigar o comportamento de saturação da superfície polimérica, a massa de NPs foi mantida constante em 1 mg, enquanto a massa de RNA foi variada sistematicamente em diferentes razões mássicas. As nanopartículas estavam dispersas em água Milli-Q, cujo pH foi aferido em aproximadamente 5,0, garantindo a reprodutibilidade das condições de interação eletrostática. Essa abordagem visou determinar a capacidade máxima de carga do sistema e o impacto da concentração de material genético na eficiência de acoplamento. A homogeneização das suspensões foi conduzida sob agitação mecânica (vórtex) por 2 minutos, assegurando o contato efetivo e a estabilização das interações eletrostáticas entre as fases.

A eficiência de adsorção do material genético na superfície das NPs poliméricas foi investigada por meio de ensaios eletrocinéticos e espectrofotométricos.

a) Avaliação por espectrofotometria

A eficiência de adsorção e a estabilidade dos complexos NP-RNA foram avaliadas por meio da quantificação do RNA livre remanescente no sobrenadante. As amostras, preparadas em razões mássicas NP:RNA variando de 1:0,005 a 1:0,06 (m/m), foram submetidas à centrifugação a 6.000 rpm por 30 minutos em unidades de ultrafiltração Amicon® (MWCO 100 kDa). Este procedimento visa a separação física dos componentes: enquanto o complexo nanovetor-RNA fica retido na membrana de corte, o ácido nucleico livre percola para o filtrado.

A quantificação do RNA recuperado foi realizada por espectrofotometria UV-Vis a 260 nm, técnica amplamente utilizada devido ao máximo de absorção característico dos nucleotídeos nesta região (NOGUEIRA *et al.*, 2024). O emprego deste método analítico justifica-se por sua alta reprodutibilidade, baixo volume de amostra requerido e facilidade operacional (LE RU *et al.*, 2025). Contudo, a presença

de nanopartículas (60–150 nm) na suspensão original impõe um desafio técnico devido ao espalhamento de luz (*scattering*), que pode interferir na leitura real da absorbância e gerar resultados imprecisos (LE RU *et al.*, 2025). A etapa de ultrafiltração é, portanto, essencial para mitigar esse efeito, garantindo que apenas a fração solúvel de RNA seja analisada.

A partir da absorbância obtida, a concentração de RNA foi determinada pela Lei de Lambert-Beer, utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida. A eficiência de adsorção foi então calculada por balanço de massa, conforme apresentado na Equação 3:

$$\%Adsorção = \frac{(Massa\ inicial\ de\ RNA - Massa\ de\ RNA\ livre)}{Massa\ inicial\ de\ RNA} \times 100$$

Equação 3 – Cálculo da eficiência de adsorção do material genético na superfície do nanovetor. A massa inicial de RNA refere-se à quantidade total adicionada à formulação, enquanto a massa de RNA livre corresponde à fração detectada no sobrenadante após a separação física das nanopartículas.

b) Avaliação indireta por meio do Potencial Zeta

Como uma primeira metodologia complementar para a comprovação da adsorção, foi utilizada as técnicas de ELS no equipamento Litesizer 500 (Anton Paar), do modo previamente apresentado no item 3.2.2. Assim, foi, primeiramente, conduzida uma titulação onde a massa das nanopartículas foi mantida constante em 1 mg, enquanto a quantidade de RNA de levedura foi gradualmente aumentada para gerar diferentes proporções NP/RNA, na faixa de 1:0,005 a 1:0,36 (m/m) Após a incubação, as amostras foram submetidas às análises de potencial zeta, permitindo determinar a quantidade ideal de RNA que pode ser adsorvida de forma eficiente. Nesse sentido, o potencial zeta é um parâmetro altamente sensível à presença de biomoléculas como RNA e DNA na interface coloidal (CARVALHO *et al.*, 2018; STETEFELD *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2017). A interação entre o RNA e a superfície da nanopartícula promove alterações na carga líquida do sistema, sinalizando a eficácia da complexação e modificações químicas na superfície do nanovetor (STETEFELD *et al.*, 2016). Conseqüentemente, espera-se que o incremento progressivo da concentração de RNA resulte em um aumento da densidade de carga negativa até que o patamar de saturação seja atingido. Esse comportamento não apenas

valida a cinética de adsorção, como também permite a construção de isothermas de ligação para quantificar o ácido nucleico associado à plataforma.

c) Avaliação indireta por Eletroforese

Por fim, foi conduzida uma eletroforese em gel de agarose para verificar qualitativamente a interação entre o RNA e as nanopartículas. Inicialmente, uma solução de agarose foi preparada na concentração de 4% p/v, utilizando 4 g de agarose em 50 mL de tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). A composição do tampão TAE 1x consiste em uma solução aquosa de Tris-base (40 mM), ácido acético (20 mM) e EDTA (1mM), com pH ajustado para aproximadamente 8,0. A mistura foi aquecida até a completa dissolução, seguida pela adição de 2,5 µL de brometo de etídio, numa concentração de 0,5 µg/mL. As amostras de nanopartículas contendo RNA adsorvido foram preparadas na proporção 1:1 (v/v) com tampão de amostra, composto por azul de bromofenol (0,01%), xileno cianol FF (0,01%) e glicerol (40%). O desenho experimental incluiu dois controles negativos: RNA livre (0,8 µM) e NPs isoladas (10 µg/µL). Para os grupos experimentais, selecionaram-se as razões mássicas que demonstraram, em ensaios prévios, eficiências de adsorção de 100% (1 mg NP : 0,01 mg RNA) e 40% (1 mg NP : 0,025 mg RNA), visando observar o deslocamento eletroforético do material genético.

A corrida eletroforética foi conduzida sob potencial constante de 70 V, utilizando um marcador de massa molecular (*DNA Ladder* de 100 pb,) como referência de migração. A integridade e o retardamento do RNA foram visualizados sob transiluminador UV, onde a ausência de bandas migratórias nos poços contendo os complexos NP-RNA confirmaria a retenção do material genético pela matriz polimérica.

3.3.1 Modelagem Matemática e Análise dos Parâmetros de Adsorção

Para uma compreensão aprofundada da interação entre as nanopartículas e o RNA, os dados experimentais obtidos no ensaio de adsorção acompanhando por carga superficial da complexação anteriormente exposto foram submetidos a um ajuste de modelo. Os dados de variação do potencial zeta em função da proporção NP/RNA foram analisados no *software* OriginPro®.

3.4. Montagem Multicamada e Internalização Celular

3.4.1. Procedimento de Montagem Multicamada (LbL)

O processo de estruturação das nanopartículas multicamadas foi realizado por meio da técnica de deposição eletrostática sequencial, conduzida em regime descontínuo. Na fase inicial de validação do recobrimento, utilizou-se RNA de levedura como modelo de material genético, adotando-se uma razão de massa RNA/NP de 0,005. Posteriormente, ao transpor a montagem para o uso de siRNA, a concentração estabelecida foi de 0,2 μM para cada 1 mg de nanopartícula. Essa proporção foi selecionada para manter a razão mássica NP/RNA em seu patamar mínimo, mimetizando as condições de saturação validadas com o RNA de levedura e assegurando a similaridade físico-química entre os sistemas.

As micelas de PEG-PCL-Maleimida, atuando como núcleo (*core*) da nanoestrutura, foram inicialmente complexadas com o RNA modelo e, em seguida, submetidas à primeira etapa de revestimento com o polieletrólito catiônico poli(L-arginina) (PLA). Essa deposição foi conduzida sob duas condições experimentais distintas, com razões PLA/NP de 2,0 e 0,2 (m/m), a fim de comparar o efeito da saturação de carga sobre as propriedades coloidais. Em ambas as condições, a solução de PLA em pH 5,5 foi adicionada à dispersão e a mistura foi agitada em vórtex durante 2 minutos. Após essa etapa, uma fração de cada amostra foi destinada à caracterização físico-química.

As frações remanescentes seguiram para a segunda etapa de deposição, destinada à formação da camada externa de ácido hialurônico (HA). Nessa fase, foi conduzida uma triagem sistemática para determinar a proporção ideal de HA, testando-se razões de massa HA/NP de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 e 5:1. As soluções de HA foram adicionadas aos sistemas intermediários (NP/RNA/PLA) e submetidas a agitação em vórtex por 2 minutos, promovendo a formação da camada aniônica externa e completando a montagem da estrutura multicamada.

3.4.2. Caracterização das NPs Recobertas

O sistema final, com arquitetura PEG-PCL-Mal/RNA/PLA/HA, foi caracterizado por DLS e ELS no equipamento Litesizer 500 (Anton Paar), seguindo o

mesmo protocolo descrito nas etapas anteriores. As análises permitiram o monitoramento das propriedades físico-químicas das nanopartículas ao longo das etapas de montagem, incluindo a variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta, de forma a registrar o comportamento coloidal e as alterações de carga superficial decorrentes das deposições sucessivas de PLA e de HA.

3.4.3. Ensaio de Internalização Celular

O ensaio de internalização citoplasmática foi conduzido com as linhagens Jurkat (cat. 0125) e MOLT-4 (cat. 0176), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas até atingirem densidade entre 2 e 5×10^5 células por poço, em placas de 24 poços contendo $500 \mu\text{L}$ de meio, e incubadas a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 . Para o monitoramento da captação celular, as nanopartículas foram complexadas com siRNA marcado com o fluoróforo FAMTM (*Fluorescein Labeling Reagent*). A marcação foi realizada utilizando o kit SilencerTM siRNA Labeling Kit (Invitrogen), seguindo estritamente as especificações do fabricante para garantir a estabilidade do sinal fluorescente. As formulações foram adicionadas aos poços e incubadas por 4 e 24 horas.

O estudo foi conduzido em duas etapas experimentais. Na primeira, avaliou-se a nanopartícula de PEG-PCL-Mal complexada apenas com siRNA, utilizada como formulação de referência, na proporção 1 mg NP : 0,2 μM siRNA. O desenho experimental incluiu cinco grupos: (i) controle negativo, composto por células em meio de cultura; (ii) controle positivo de transfecção, utilizando Lipofectamina RNAiMax em meio Opti-MEM ($0,6 \mu\text{L}$ de siRNA-FAMTM a $10 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{L}$ do reagente); (iii) siRNA livre, contendo siRNA-FAMTM a 200nM ; (iv) nanopartícula de PEG-PCL-Mal sem carga de RNA, para avaliação da citotoxicidade intrínseca do copolímero; (v) nanopartícula estabilizada durante a síntese com surfactante P407 sem carga, para controle de toxicidade do surfactante; (vi) nanopartícula de PEG-PCL-Mal sem surfactante complexada ao siRNA-FAMTM; e (vii) nanopartícula estabilizada com P407 complexada ao siRNA-FAMTM.

Na segunda etapa, avaliou-se o sistema completo incorporando as camadas de PLA e HA, nas proporções de 1 mg NP : 0,2 μM siRNA : 0,2 mg PLA : 5 mg HA.

Para a formação da plataforma multicamada, utilizou-se uma unidade de 0,05 mg de nanopartículas, a qual serviu como suporte para a adsorção de siRNA e o subsequente recobrimento polimérico. A montagem seguiu a técnica de deposição eletrostática sequencial, conforme descrito no tópico 3.4.1, iniciando-se pela complexação do siRNA ao núcleo de PEG-PCL-Mal (estabilizado com P407), seguida pela adsorção da camada catiônica de PLA e, por fim, pela deposição da camada externa aniônica de HA. As condições testadas compreenderam: (i) controle negativo (células não tratadas); (ii) controle positivo de transfecção; (iii) siRNA-FAMTM livre a 200nM; e (iv) sistema multicamada final (NP-P407-siRNA-PLA-HA).

Após os períodos de incubação de 4 e 24 horas, as células foram submetidas a ciclos de lavagem com PBS para remoção de material não internalizado e analisadas em citômetro de fluxo modelo BD AccuriTM C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). O processamento dos dados permitiu a quantificação da fluorescência intracelular (canal FL1-A) e a avaliação da integridade morfológica das populações celulares por meio dos parâmetros de dispersão de luz (*Forward Scatter* - FSC-A e *Side Scatter* - SSC-A), possibilitando a análise comparativa da eficiência de internalização e da biocompatibilidade sugestiva de todas as formulações, assim como dos controles.

CAPÍTULO IV: Resultados e Discussão

4.1. Síntese e Caracterização das NPs

4.1.1. Tamanho e Polidispersão

A caracterização físico-química das nanopartículas, abrangendo parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta e morfologia, constitui uma etapa essencial na otimização do processo de nanoprecipitação. Tais propriedades refletem diretamente as variáveis de formulação e processamento, permitindo o ajuste racional da síntese e o controle rigoroso da estabilidade coloidal do sistema (HERNÁNDEZ-GIOTTONINI *et al.*, 2020).

Para determinar a melhor condição de síntese, foram avaliados dois surfactantes, P407 e PVA, em comparação a uma condição de controle (sem surfactante). A escolha desses surfactantes se baseou, principalmente, em suas características de biocompatibilidade e baixa toxicidade (SUN *et al.*, 2019; BLONDER *et al.*, 1999).

A técnica de DLS não só foi empregada para a caracterização inicial das nanopartículas, mas também para monitorar as alterações nas propriedades físicas e superficiais durante as diferentes etapas de funcionalização, como apresentado na Figura 3. Isso permitiu comparar as condições das partículas modificadas com as partículas não modificadas ao longo do processo.

A curva Controle (quadrados cinzas) representa a síntese sem surfactante. As curvas PVA (círculos vermelhos) e P407 (triângulos azuis) indicam a presença dos respectivos surfactantes na formulação. O eixo X mostra o diâmetro da partícula em nanômetros (nm) e o eixo Y representa a intensidade da dispersão de luz em porcentagem (%). As medições foram feitas por DLS para avaliar o efeito dos surfactantes no tamanho das nanopartículas

Os valores de tamanho médio (nm), Desvio padrão e DPR% (Desvio Padrão Relativo Porcentual) foram obtidos a partir das análises de DLS.

A análise de tamanho das nanopartículas sintetizadas, apresentada na Figura 3 e na Tabela 1, demonstrou o impacto significativo dos surfactantes na estabilidade e

no diâmetro hidrodinâmico. Na Figura 3, ao mostrar a distribuição do diâmetro das partículas para cada condição de síntese, observa-se que a condição Controle e a com PVA resultaram em distribuições mais amplas, indicando uma maior heterogeneidade nos tamanhos das nanopartículas. Por outro lado, a condição com P407 apresentou uma distribuição estreita, evidenciando uma maior uniformidade e estabilidade do sistema.

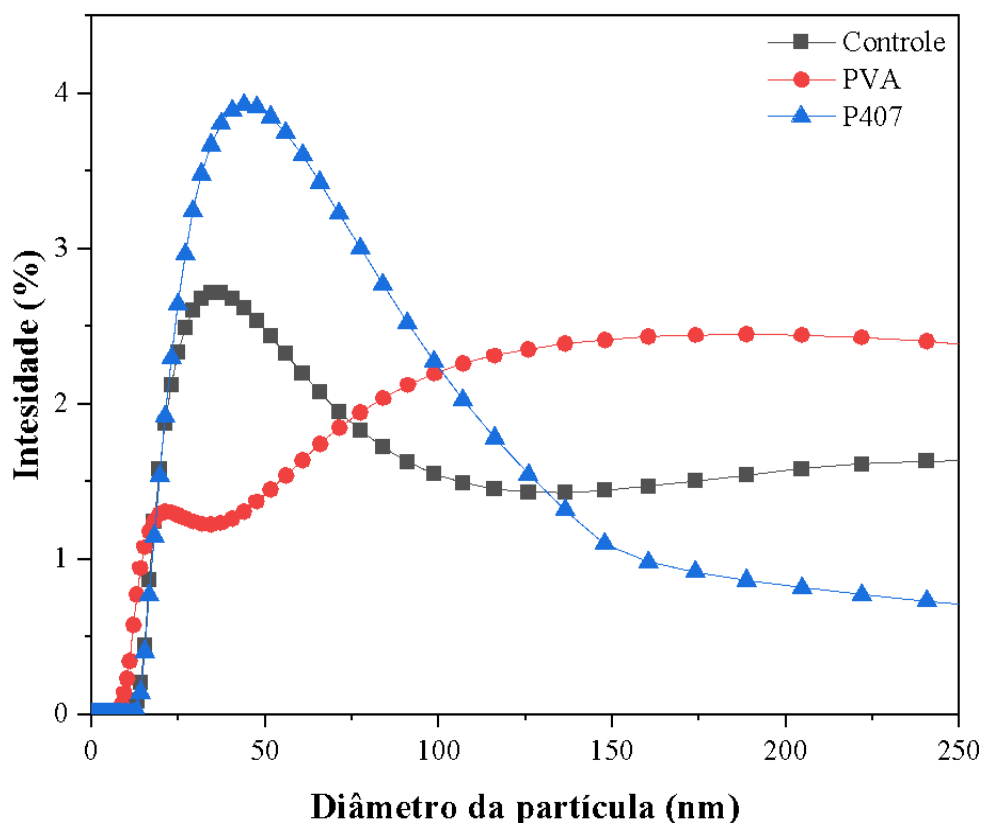


Figura 3. Distribuição do diâmetro de nanopartículas em diferentes condições de síntese. O perfil do DLS ilustra o impacto da adição de surfactantes no controle do diâmetro hidrodinâmico durante o processo de nanoprecipitação. A curva Controle (quadrados cinzas), correspondente à síntese sem estabilizante, revela um sistema polidisperso com tendência à agregação. A utilização de PVA (círculos vermelhos) resultou em um perfil com deslocamento para maiores diâmetros e alta polidispersão. Em contraste, a formulação contendo P407 (triângulos azuis) apresentou o melhor desempenho de estabilização, exibindo um pico de intensidade estreito e monomodal focado na região de nanômetros, o que justifica a seleção do P407 (1% m/v) como o surfactante padrão para as etapas subsequentes de adsorção de RNA e recobrimento polimérico.

A Tabela 1 quantifica esses resultados. O P407 se destacou ao gerar nanopartículas com o menor tamanho médio (72,6 nm) e a menor variabilidade

(DPR% de 16,92%), o que o qualifica como o agente estabilizador mais eficaz para esta aplicação. O P407 atua como um surfactante biocompatível, aprimorando a entrega de medicamentos ao estabilizar as nanopartículas e formar micelas para encapsular fármacos hidrofóbicos (NUGRAHA; ANGGADIREDDA; RACHMAWATI, 2022). Sua ação de estabilização ocorre por dois mecanismos principais, impulsionados por sua natureza anfífila (SAKHI *et al.*, 2023). Primeiramente, o impedimento estérico se manifesta devido à estrutura de copolímero em bloco do P407, com cadeias hidrofílicas de óxido de polietileno (PEO) e hidrofóbicas de óxido de polipropileno (PPO). Os segmentos de PPO se ancoram à superfície das nanopartículas, enquanto as cadeias de PEO se estendem para o meio aquoso, formando uma barreira física que impede a aglomeração por repulsão estérica (SANTOS *et al.*, 2020). Em segundo lugar, essa mesma organização dos blocos diminui a tensão interfacial entre as fases hidrofóbicas e aquosas, o que contribui para estabilizar as nanopartículas e prevenir a sua agregação (SANTOS *et al.*, 2020). Embora em doses muito altas, o P407 possa causar hiperlipidemia, toxicidade renal e vacuolização do fígado em estudos com animais, as doses clínicas para aplicações de entrega de medicamentos são mantidas abaixo dos níveis (cerca de 400mg/kg do animal modelo) que causam esses efeitos (BLONDER *et al.*, 1999).

Em contraste, as nanopartículas sintetizadas com PVA e as do grupo controle, exibiram tamanhos médios significativamente maiores e distribuições mais dispersas, com DPR% acima de 40%, indicando um alto grau de aglomeração. Diferentemente dos surfactantes típicos, o PVA não possui uma estrutura de cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica, mas atua como um estabilizador ao aderir à superfície das partículas por meio de ligações de hidrogênio e criar uma camada hidrofílica protetora, oferecendo, portanto, uma estabilização estérica e eletroestérica que previne a agregação das nanopartículas (HONG; HONG; SHIM, 2007).

Com base nesses resultados, a presença de P407 foi determinante para a produção de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico abaixo de 100 nm e com alta estabilidade, atendendo a um requisito crucial para a aplicação desejada. Dessa forma, o P407 foi selecionado para ser parte da formulação do carreador em desenvolvimento.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas sintetizadas em diferentes formulações

	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Desvio padrão	DPR%
Controle	280,3	130,7	46,6%
PVA	240,6	105,5	43,8%
P407	72,6	12,2	16,9%

Como extensão, realizou-se a avaliação da estabilidade temporal do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. O monitoramento da estabilidade coloidal é um fator determinante para sistemas destinados ao armazenamento em meios aquosos, visto que oscilações no diâmetro médio ou o surgimento de populações agregadas podem comprometer o desempenho terapêutico. Nesse contexto, micelas poliméricas constituídas por copolímeros em bloco, como o PEG-PCL, são frequentemente descritas como estruturalmente estáveis em virtude de seus baixos valores de CMC, o que favorece a integridade da nanoestrutura mesmo sob condições de diluição (ALAMI-MILANI *et al.*, 2018; BABANYINAH *et al.*, 2024).

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram que a formulação de PEG-PCL-Mal estabilizada com P407 a 1% (triângulos azuis) mantém, imediatamente após a síntese, uma distribuição de tamanho estreita e monomodal, com pico abaixo de 100 nm. Após 60 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C) (hexágonos verdes), observa-se a preservação do pico principal em aproximadamente 72 nm. Essa persistência confirma a capacidade do P407 em estabilizar a população majoritária e indica a ausência de um colapso estrutural generalizado do sistema.

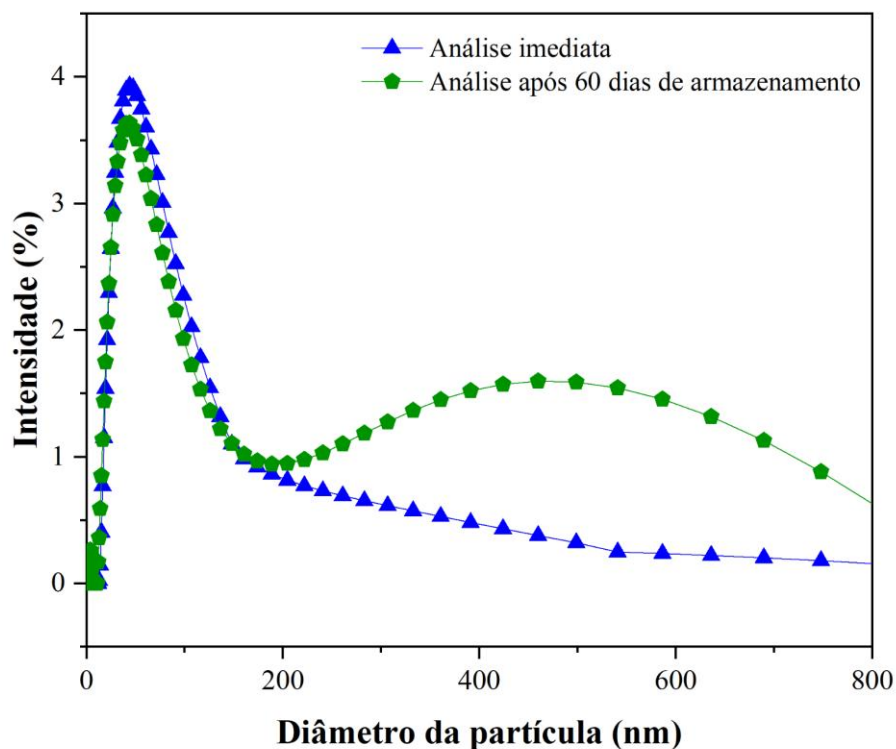


Figura 4. Estabilidade temporal da distribuição de tamanho NP de PEG-PCL-Mal (P407 1%). O perfil de DLS compara a Análise imediata (triângulos azuis) com a Análise após 60 dias de armazenamento (pentágonos verdes). A persistência do pico primário em aproximadamente 72,6 nm evidencia a robustez da formulação original e a eficácia do P407 na manutenção da população majoritária. Em contrapartida, o surgimento de uma segunda população polidispersa entre 300 nm e 800 nm indica a formação de *clusters* metastáveis e processos de agregação parcial. Esses fenômenos, embora não representem o colapso completo do sistema, são característicos do envelhecimento de micelas em solução aquosa e sinalizam uma transição para uma distribuição multimodal sob armazenamento prolongado.

Entretanto, o surgimento de uma segunda população polidispersa na faixa de 300 a 800 nm revela a ocorrência de processos de agregação parcial ao longo do tempo. Essa distribuição multimodal é característica do envelhecimento de sistemas em solução aquosa, onde a estabilização estérica é suficiente para manter a maior parte das nanopartículas isoladas, mas não impede completamente eventos de colisão e fenômenos de *bridging* entre frações da amostra. Estudos de estabilidade enfatizam que a agregação parcial é virtualmente inevitável em sistemas nanométricos, dependendo da composição e do tempo de estocagem (HUSSAIN *et al.*, 2023). Em

sistemas de nanopartículas lipídicas e micelares estabilizados por poloxamer, reduções na quantidade de surfactante ou envelhecimento também levam a aumento de tamanho e queda na concentração de partículas, efeito atribuído à coalescência/agrupamento progressivo. Assim, ainda que a formulação se mostre globalmente estável do ponto de vista da fração majoritária nanométrica, a detecção dessa população agregada evidencia um desafio intrínseco à manutenção da estabilidade coloidal em longo prazo e reforça a necessidade de otimização de parâmetros de formulação e condições de estocagem para minimizar a formação de partículas suprananométricas indesejáveis (RIBEIRO *et al.*, 2018)

Em termos de aplicação biológica e farmacêutica, esses resultados indicam alguns caminhos importantes. Primeiro, é necessário estabelecer um prazo de validade rigoroso para garantir que essa parcela de agregados não comprometa a segurança ou a eficiência do tratamento no corpo. Além disso, pode-se avaliar formulações otimizadas por meio de ajuste na concentração de P407 ou do próprio polímero, por exemplo, de modo a retardar a agregação das nanopartículas. Por fim, o uso de protetores térmicos e a conservação no estado sólido (liofilização) surgem como boas alternativas para evitar que essas partículas maiores apareçam, mantendo a estrutura original das micelas por períodos mais prolongados.

4.1.2. Potencial Zeta e Ponto Isoelétrico (pI)

Para complementar essa análise, buscou-se determinar o ponto isoelétrico (pI) das nanopartículas. O pI, definido como o pH em que a carga líquida da nanopartícula é zero, é um parâmetro fundamental para prever e controlar sua carga superficial em diferentes condições. A carga superficial varia em função do pH: as nanopartículas se tornam negativas em pH acima do pI e positivas em pH abaixo do pI.

O fato de as micelas de PEG-PCL-Mal serem sensíveis ao pH, devido à capacidade de ionização do grupo maleimida, torna-se crucial entender como essa variação de carga superficial ocorre. Isso porque a carga superficial das nanopartículas influencia diretamente a interação com barreiras biológicas, a biodistribuição e a captação celular (CARRASCO *et al.*, 2021). Enquanto micelas comuns podem liberar o medicamento em qualquer lugar, as sensíveis ao pH são capazes de se manter intactas no sangue, em

pH fisiológico normal de aproximadamente 7,4. No entanto, em ambientes mais ácidos, como em tecidos tumorais (pH entre 6,5 e 6,8) ou em compartimentos intracelulares (pH entre 5 e 6), elas se desfazem, liberando o fármaco exatamente no local desejado (ZHOU *et al.*, 2018). Essa liberação seletiva aumenta a concentração do medicamento no alvo, tornando-o mais eficaz, e reduz a quantidade de medicamento que atinge tecidos saudáveis, resultando em um tratamento mais seguro e com menos efeitos colaterais.

A análise do potencial zeta em função do pH, ilustrada na Figura 5, revela que o potencial zeta é predominantemente negativo em toda a faixa avaliada (de 2 a 8), indicando que o ponto isoelétrico (pI) da nanopartícula está em um pH inferior a 2. Esse resultado está condizente com a literatura sobre nanopartículas de PEG-PCL, que demonstra que essas micelas tendem a manter uma carga levemente negativa a quase neutra (BEHL *et al.*, 2023). A funcionalização com o grupo maleimida teve um impacto mínimo no potencial zeta original das micelas, o que era esperado, já que esses grupos são, em sua maioria, neutros (LI; TAKEOKA, 2013).

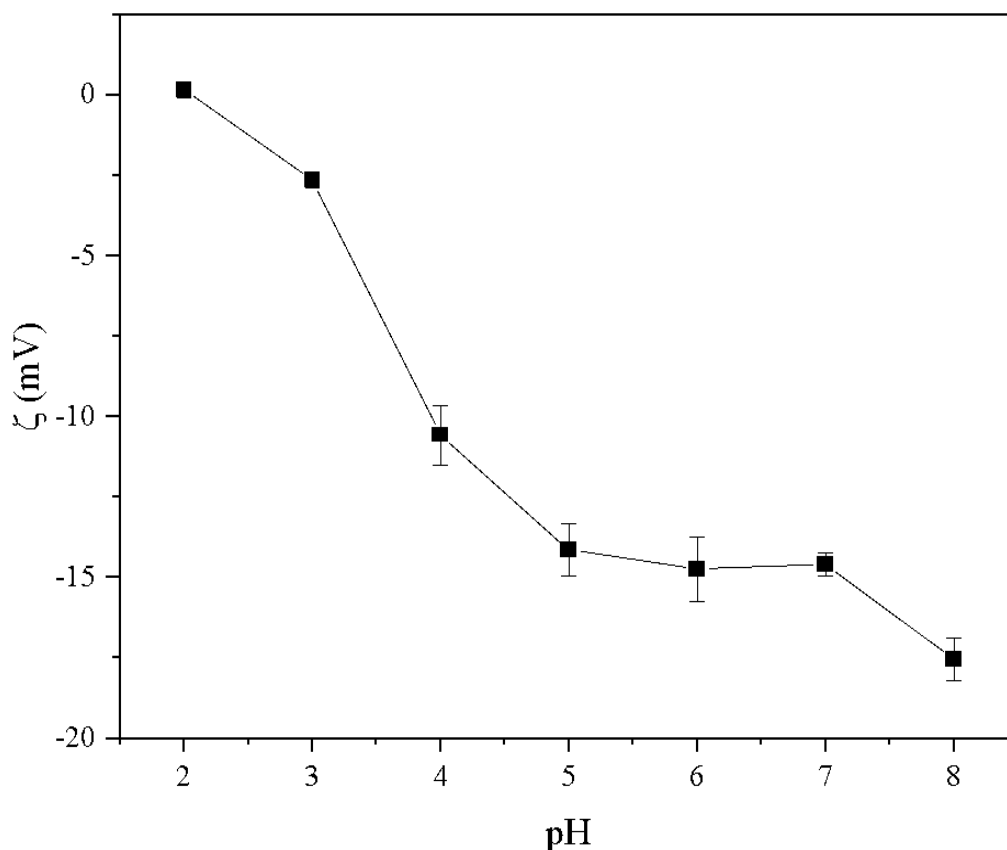


Figura 5. Variação do Potencial Zeta em Função do pH da NP de PEG-PCL-Mal (P407 1%). O gráfico apresenta o comportamento eletrocinético das nanopartículas originais frente à variação da concentração hidrogeniônica do meio. O eixo das ordenadas indica o potencial zeta em milivolts (mV), enquanto o eixo das abscissas detalha a faixa de pH analisada, de 2,0 a 8,0. Os pontos experimentais representam a média de cinco medições independentes, com as respectivas barras de erro indicando o desvio padrão. Observa-se o ponto de carga zero em pH 2,0, seguido por um decréscimo na carga superficial que se estabiliza em patamares aniônicos a partir de pH 5,0.

A carga superficial negativa em pH fisiológico (~7,4) e em ambientes endossômicos (~5-6) sugere que as interações eletrostáticas com biomoléculas de carga negativa, como o RNA, não seriam favoráveis. Portanto, a adsorção de RNA à superfície da nanopartícula, caso observada, não se basearia na atração eletrostática, apontando para a importância de outros mecanismos de ligação. Dessa forma, a estratégia de adsorção se concentraria nas interações mediadas pelos grupamentos de maleimida. Essas interações representam a aposta principal para a ligação do RNA à nanopartícula, embora a literatura aponte que a conjugação eficiente entre maleimida

e RNA requer a modificação do RNA com a adição do grupamento tiol (SHAO *et al.*, 2023).

Adicionalmente, a variação do potencial zeta mostra que a carga se torna progressivamente mais negativa com o aumento do pH, atingindo um platô entre pH 5 e 6, e continuando a diminuir até o pH 8. Sugere-se que esse comportamento garanta uma estabilidade coloidal razoável da suspensão, pois a repulsão eletrostática entre as partículas as impede de se aglomerarem, o que é um fator positivo para a formulação do sistema de entrega.

Dessa forma, a estabilidade da carga superficial das NPs foi avaliada por meio de medições de potencial zeta em dois momentos distintos, com um intervalo de dois meses. A tabela 2 mostra que, na análise imediata à sua síntese, o potencial zeta médio era de -10,4 mV com um DPR% de 6,5%. Dois meses depois, o potencial zeta apresentou um valor de -13,01 mV, com um DPR% de 10,5%. A variação do potencial zeta para um valor mais negativo ao longo do tempo, juntamente com o leve aumento do DPR%, sugere que a estabilidade da carga superficial foi mantida, apesar de uma ligeira alteração nas propriedades da suspensão. Esse comportamento pode ser influenciado principalmente por dois fatores. O primeiro é a estabilização estérica, um efeito causado tanto pelo surfactante quanto pela camada de PEG na superfície (HOU *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2020). O segundo é a baixa Concentração Micelar Crítica (CMC) das micelas de PEG-PCL, auxiliando que elas permaneçam estáveis e intactas mesmo em baixas concentrações (HOU *et al.*, 2022). Portanto, a estabilidade coloidal sugerida é confirmada por esses resultados.

Tabela 2. Acompanhamento da estabilidade da carga superficial das formulação selecionada

Data da medição	Potencial Zeta médio (mV)	Desvio padrão	DPR%
Análise imediata	-10,4	0,6	6,5%
Análise após 60 dias de armazenamento (4°C)	-13,01	1,3	10,5%

4.1.3. Esterilidade

A verificação da esterilidade das nanopartículas constitui uma etapa essencial para assegurar a segurança e reprodutibilidade das formulações em estudos biológicos, evitando interferências nos ensaios celulares subsequentes. Para essa avaliação, amostras de PEG-PCL-Mal foram sintetizadas sob duas condições distintas, em bancada aberta e em fluxo laminar, e, posteriormente, incubadas por sete dias a 37°C e 5% CO₂ em meio RPMI 1640, com e sem antibiótico. Parte das amostras também foi submetida à filtração em membrana de 0,22 µm para comparação do efeito desse tratamento.

Após o período de incubação, não foram observados sinais de contaminação microbiana em nenhuma das condições testadas. O meio permaneceu límpido e inalterado, sem evidência de turbidez, crescimento celular ou alterações morfológicas, conforme verificado por inspeção visual e microscopia óptica (Figura 6).

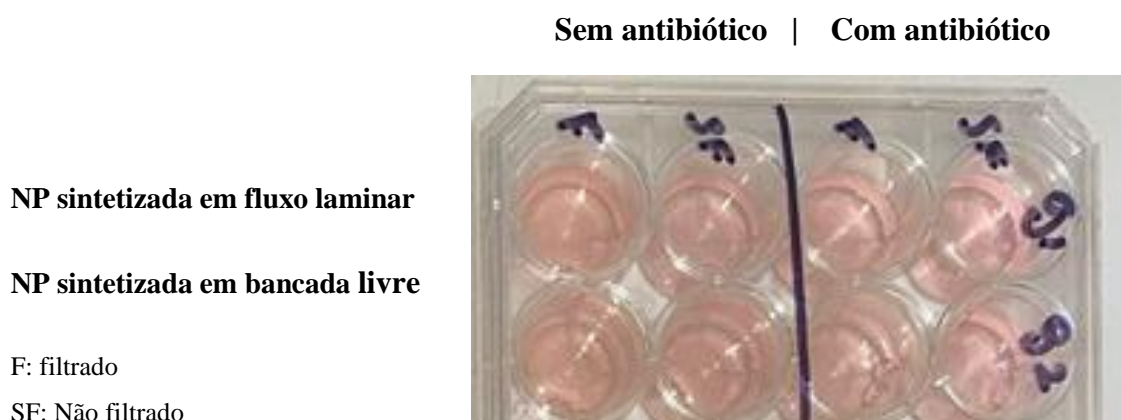


Figura 6. Verificação visual de esterilidade e ausência de turbidez em meio de cultura. A imagem apresenta o resultado do ensaio de esterilidade conduzido em placa de cultura de células. Observa-se que o meio de cultura, após o período de incubação, permanece translúcido e com coloração inalterada em todas as condições testadas, tanto em fluxo laminar quanto em bancada livre. A ausência de turbidez ou depósitos é um indicativo visual direto de que o sistema está livre de contaminação microbiana, validando os protocolos de assepsia adotados durante a síntese e o pré-tratamento das nanopartículas.

Esses resultados indicam que o processo de nanoprecipitação apresenta baixo risco intrínseco de contaminação, possivelmente devido à utilização de solventes orgânicos voláteis e ao tempo reduzido de exposição ambiental durante a síntese, que

limitam a sobrevivência microbiana (WATCHARADULYARAT *et al.*, 2023). A ausência de crescimento mesmo nas amostras produzidas em bancada aberta demonstra que o controle ambiental, embora desejável, não é essencial para evitar uma contaminação microbiológica neste tipo de sistema. Ainda assim, a filtração por membrana de 0,22 μm mostrou-se uma medida eficaz para eliminar eventuais contaminantes residuais, assim como agregados, e garantir a segurança microbiológica e estabilidade coloidal das formulações, assegurando a adequação das nanopartículas para os ensaios celulares subsequentes.

4.2. Resultados do Estudo de Adsorção de RNA

4.2.1. Eficiência de Adsorção

Para avaliar a adsorção entre as nanopartículas de PEG-PCL-Mal e o RNA, utilizou-se o RNA de levedura como modelo. Essa escolha é uma estratégia metodológica justificada na fase inicial de formulações de sistema de entrega de ácidos nucleicos, não apenas pela similaridade de sua natureza polianiónica com o siRNA, devido ao seu esqueleto de fosfato, mas também pela sua maior disponibilidade e menor custo. Além disso, a validade dessa abordagem reside no fato de que o RNA de levedura interage com a superfície de nanopartículas de forma análoga ao siRNA (WILLIFORD *et al.*, 2014). As interações eletrostáticas são a força principal nos sistemas de nanopartículas poliméricas-RNA (CORNEBISE; BARBER, 2022; JIANG; ABEDI; SHI, 2023), porém vale ressaltar que ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e efeitos hidrofóbicos e estruturais também contribuem para a estabilidade e função do complexo (CORNEBISE *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o objetivo principal do uso do RNA de levedura é a investigação de fenômenos de adsorção mais gerais, como a avaliação das alterações na carga superficial, no tamanho e na capacidade de ligação das nanopartículas. Isso permite, portanto, a realização de ensaios preliminares em larga escala, ajustando as condições de adsorção de forma eficiente antes de se prosseguir com o uso do siRNA, que possui maior valor agregado.

Contudo, é crucial reconhecer as limitações dessa metodologia. O RNA de levedura usado nesse estudo é um *pool* de diferentes tipos de RNA (como RNA mensageiro, RNA ribossomal e RNA transportador), o que resulta em uma amostra heterogênea com uma ampla gama de tamanhos e conformações estruturais. Por outro lado, o siRNA é uma molécula curta e bem definida, com uma estrutura de fita dupla de aproximadamente 21-23 nucleotídeos (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001). Essa diferença estrutural e dimensional implica que os resultados de adsorção obtidos com o RNA de levedura podem não mimetizar perfeitamente o comportamento do siRNA. Adicionalmente, sabe-se que as características do RNA, como ser de fita simples ou dupla, afetam diretamente a sua taxa de adsorção (COX; LIM; CHUNG, 2022). Nesse sentido, aqueles com fita dupla tendem a ter uma taxa de adsorção mais lenta em comparação com aqueles de fita simples (COX; LIM; CHUNG, 2022). Além disso, a heterogeneidade do *pool* de RNA de levedura pode impactar a densidade de empacotamento, a cinética de liberação e a atividade biológica do complexo final (BONNEAU *et al.*, 2023). Portanto, para a realização de estudos funcionais e avaliações de eficácia terapêutica, o uso do siRNA autêntico é indispensável para assegurar a relevância e a precisão dos resultados.

Estabelecida a justificativa da escolha inicial pelo RNA de levedura como modelo experimental, a caracterização da interação entre esse material genético e as nanopartículas de PEG-PCL-Mal foi conduzida através de três abordagens complementares. Essas metodologias visam correlacionar a massa de RNA adsorvida com as alterações físico-químicas e a estabilidade do complexo formado. Assim, a eficiência de adsorção foi quantificada e validada pelos seguintes métodos:

a) Avaliação por espectrofotometria

A Figura 7 ilustra a porcentagem de RNA adsorvido (eixo Y) em função das diferentes proporções mássicas de RNA para cada 1 mg de nanopartícula (eixo X). A análise demonstra uma alta eficiência de adsorção em todas as proporções testadas, com a proporção mais baixa (0,005 mgRNA:1mgNP) atingindo uma adsorção próxima de 100 %, um comportamento esperado para sistemas otimizados onde as interações entre o RNA (molécula carregada negativamente) e o carreador (geralmente carregado positivamente) são fortes (GOROHOVS; DEKHTYAR, 2025).

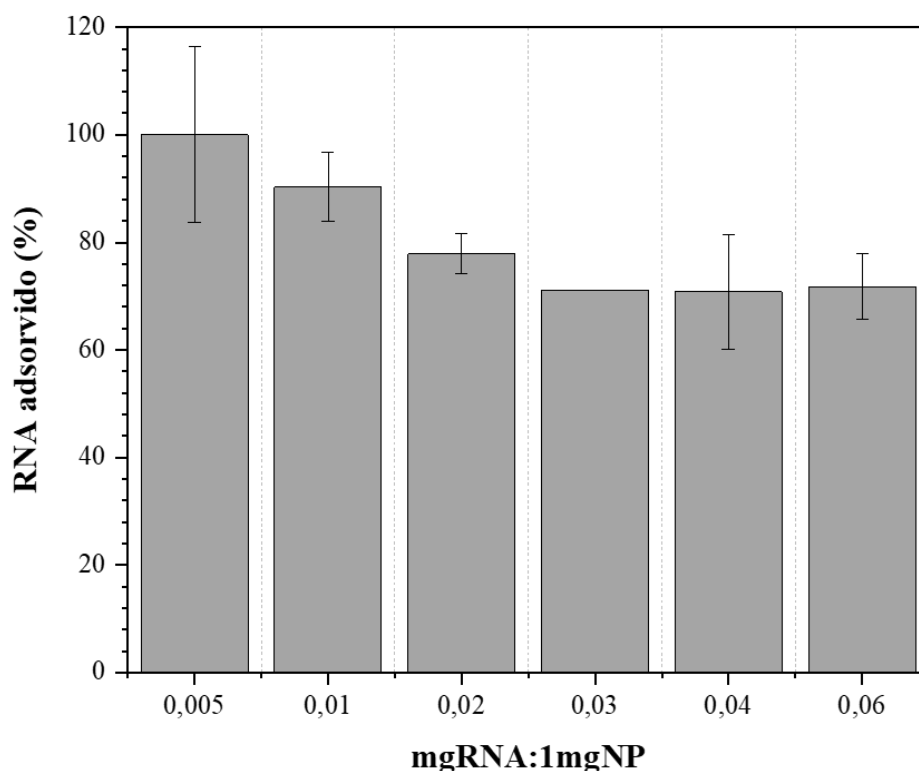


Figura 7. Porcentagem de RNA adsorvido nas nanopartículas em função da proporção mássica de mg de RNA por 1 mg de NP. O gráfico apresenta a eficiência de adsorção do material genético à superfície das nanopartículas. O eixo das abscissas detalha as proporções mássicas testadas, variando de 0,005 a 0,06 mg de RNA para cada 1 mg de nanopartícula, enquanto o eixo das ordenadas indica a porcentagem relativa de RNA efetivamente adsorvido. Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata, com as barras de erro indicando o desvio padrão.

À medida que a proporção de RNA é aumentada, a porcentagem de RNA adsorvido diminui gradualmente. Isso implica que maiores concentrações da biomolécula em solução estão em equilíbrio com maiores concentrações da biomolécula adsorvida, como esperado. Esse comportamento pode ser explicado pelos princípios de interação entre superfícies e adsorvatos. No caso deste trabalho, por utilizar-se um *pool* de RNA de levedura que é intrinsecamente heterogêneo em tamanho e conformação (HUANG *et al.*, 2013,) podem ser observadas interações menos eficientes com os sítios de ligação da nanopartícula, resultando em variações na adsorção que dependem da posição e da forma como as diferentes moléculas de RNA interagem com o carreador. Além disso, a heterogeneidade da superfície das nanopartículas e das próprias biomoléculas influencia a interação de forma dependente da massa das moléculas envolvidas (HUANG *et al.*, 2013).

Em um *pool* heterogêneo de RNA, as moléculas maiores ou com conformações menos compactas podem competir pelos sítios de ligação de forma menos ideal do que as moléculas mais compactas (ARMANIOUS *et al.*, 2022). Ao se ligarem, essas moléculas maiores podem ocupar o espaço de forma ineficiente ou até mesmo impedir a ligação de outras moléculas nas proximidades, um fenômeno que se torna mais evidente em altas concentrações de RNA, onde os sítios de adsorção são limitados (ARMANIOUS *et al.*, 2022). Essa variação na interação é análoga ao que ocorre em estudos com outras biomoléculas heterogêneas, como proteínas, onde o comportamento de adsorção é influenciado pela nanoestrutura da superfície para moléculas pequenas, mas moléculas grandes tendem a "envolver" as nanopartículas, reconhecendo menos as diferenças de superfície (HUANG *et al.*, 2013). De forma similar, moléculas de RNA de diferentes tamanhos interagem com eficiências variadas, levando à redução da porcentagem total adsorvida quando a saturação é atingida.

Como uma forma alternativa de representar a interação superficial, a Figura 8 ilustra a isoterma de adsorção do RNA de levedura nas NPs. O gráfico correlaciona a massa de RNA livre em suspensão (eixo X, RNA_{eq} em mg) com a proporção inicial de RNA adicionada por miligrama de nanopartícula (eixo Y). O comportamento da curva exibe um incremento linear da fração não adsorvida em resposta ao aumento da carga inicial, o que poderia sugerir uma tendência de conformidade ao Modelo de Adsorção de Langmuir (XU *et al.*, 2022). Esse modelo assume que a adsorção ocorre em sítios específicos e limitados na interface da nanopartícula, resultando na formação de uma monocamada molecular, onde o excedente de RNA permanece livre na fase contínua após a ocupação total dos sítios disponíveis.

Contudo, se esse ajuste for verdadeiro, a curva parece estar interrompida, indicando que para a confirmação definitiva do modelo de Langmuir, é necessário a inclusão de novos pontos experimentais com concentrações de RNA superiores às testadas. Assim, o objetivo seria identificar a região de flexão da curva, onde atingiria um platô, conforme previsto pelo modelo. Por outro lado, a magnitude das barras de erro nos pontos de maior concentração (0,03 a 0,05 mg de RNA) permite interpretações ambivalentes, incluindo a possibilidade de o sistema seguir um perfil de adsorção em multicamadas. Portanto, para ratificar essas hipóteses e sanar as ambiguidades interpretativas, faz-se necessário o refinamento do ensaio, ampliando a

razão RNA:NP e buscando a redução da variabilidade experimental para estabilizar as barras de erro.

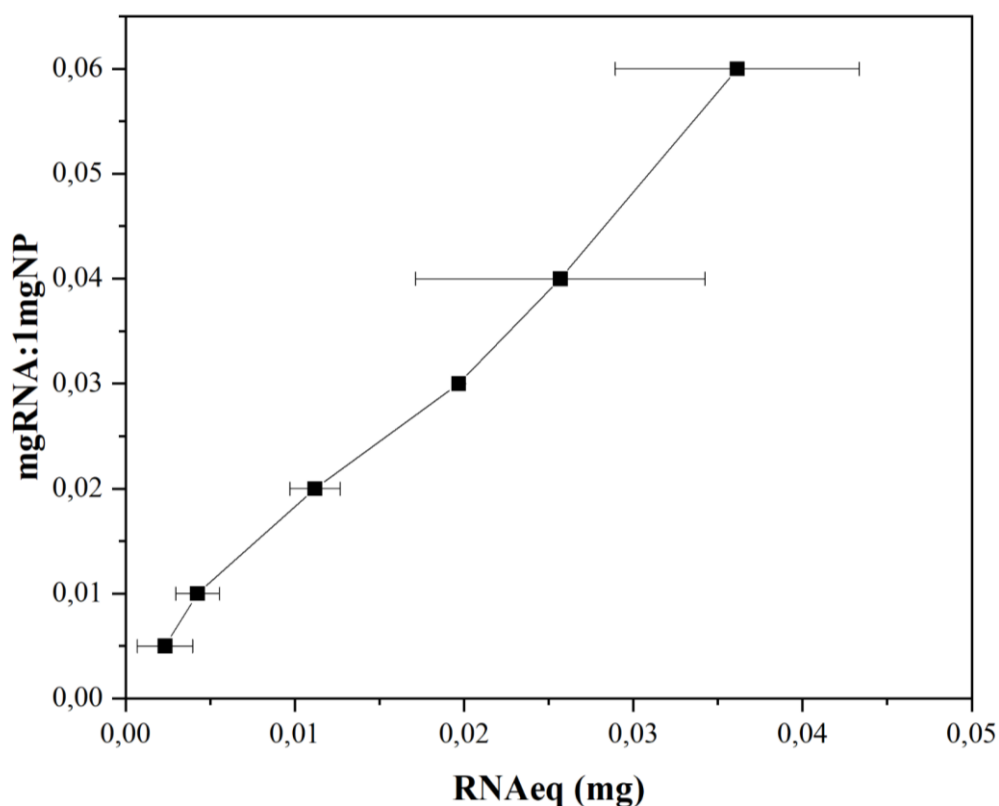


Figura 8. Isoterma de adsorção do RNA de levedura nas nanopartículas. O gráfico apresenta a correlação entre a proporção de RNA adicionada ao sistema e a massa de material genético que permanece não adsorvido (livre em suspensão) após o equilíbrio coloidal. O eixo das ordenadas indica a proporção inicial de RNA por miligrama de nanopartícula (mg RNA : 1 mg NP), enquanto o eixo das abscissas detalha a massa de RNA em equilíbrio (RNAeq) em miligramas. Os pontos experimentais estão representados com suas respectivas barras de erro (desvio padrão, n=3).

b) Avaliação indireta por meio do Potencial Zeta

Como metodologia complementar para a comprovação da adsorção, análises de potencial zeta pela técnica de ELS também foram realizadas. De forma análoga à metodologia de adsorção já descrita, o ensaio consistiu em fixar a massa das nanopartículas e variar a quantidade de RNA adicionado, com o objetivo de monitorar o comportamento dessa interação e obter indícios da ocorrência de adsorção. Nesse sentido, o potencial zeta, que reflete a carga superficial das nanopartículas, é um parâmetro altamente sensível à adsorção de biomoléculas como RNA e DNA

(CARVALHO *et al.*, 2018; STETEFELD *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2017). Quando o RNA se liga à superfície da nanopartícula, o potencial zeta se altera, o que indica uma ligação bem-sucedida e mudanças na química superficial do material (STETEFELD *et al.*, 2016). Assim, a análise do potencial zeta pode ser usada para monitorar a cinética de adsorção em tempo real. Nesse contexto, espera-se que, à medida que as biomoléculas são adicionadas às nanopartículas, a medição do potencial zeta mostra um aumento progressivo da carga negativa até atingir a saturação. Esse comportamento permite a construção de curvas de calibração para prever a quantidade de ácido nucleico adsorvido.

A Figura 9 ilustra a variação do potencial zeta das nanopartículas em função do aumento da proporção mássica de RNA de levedura adicionado (RNA:1mg NP em mg) em pH 5,5. Nessa perspectiva, o ensaio revelou um comportamento coerente com o esperado para a adsorção de uma biomolécula aniônica (GOROHOVS; DEKHTYAR, 2025). O gráfico demonstra uma tendência progressiva de aumento da carga negativa, variando de aproximadamente -9mV nas proporções iniciais para cerca de -20mV nas concentrações mais elevadas.

Essa acentuação da negatividade do potencial zeta é a evidência primária da ligação bem-sucedida do RNA, que possui carga negativa, à superfície da nanopartícula, indicando uma alteração na química superficial do material. A partir da proporção de 0,25mg de RNA por 1mg de NP em diante, observa-se uma atenuação na taxa de variação da carga, culminando em um platô de saturação por volta de 0,30 mgRNA:1mgNP. Este comportamento indica que os sítios de ligação da nanopartícula estão saturados. Apesar da nanopartícula possuir uma carga basal negativa, a adsorção do RNA ocorre e a carga do sistema se torna ainda mais negativa. Isso sugere que as interações de estabilização não dependem unicamente da atração eletrostática, mas são impulsionadas por outros mecanismos, como as ligações mediadas pelo grupo maleimida ou forças de van der Waals, o que está em concordância com a hipótese de que a conjugação com a maleimida contribui de forma importante para a fixação do RNA (GOROHOVS; DEKHTYAR, 2025).

O ponto de saturação identificado por essa curva é fundamental para validar os resultados da quantificação por balanço de massa e para a modelagem de isoterma de adsorção, fornecendo a proporção ideal que maximiza a carga de RNA e mantém a estabilidade do complexo.

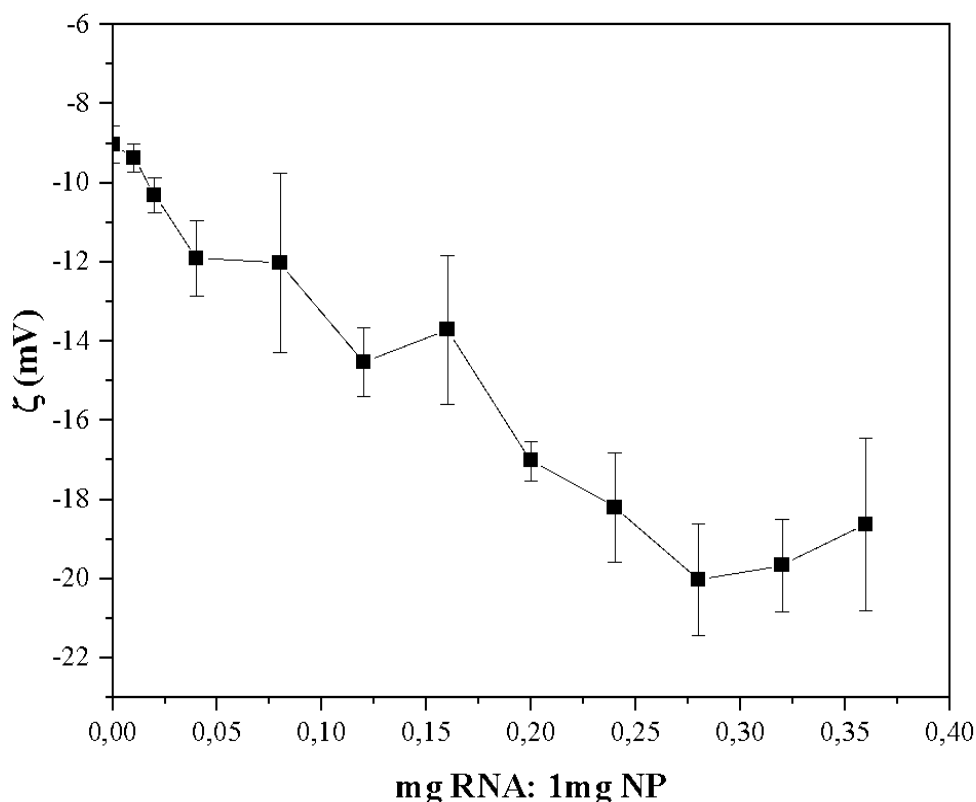


Figura 9. Variação do Potencial Zeta das Nanopartículas em função da proporção de RNA de levedura adicionado. O gráfico ilustra o comportamento eletrocinético da interface coloidal durante o processo de adsorção do material genético. O eixo das ordenadas indica o potencial zeta em milivolts (mV), enquanto o eixo das abscissas detalha a proporção de RNA adicionado por miligrama de nanopartícula (mg RNA : 1mg NP). Observa-se que a carga superficial torna-se progressivamente mais negativa com o aumento da concentração de RNA, partindo de aproximadamente -9mV e atingindo um patamar de saturação próximo a -20 mV a partir da proporção de 0,30mg RNA: 1 mg NP. Os pontos experimentais representam a média de três medições independentes, com as barras de erro indicando o desvio padrão. A acentuação da carga negativa constitui evidência física direta da adsorção do RNA à superfície da nanopartícula.

c) Avaliação indireta por Eletroforese

A eletroforese do complexo RNA–NP foi selecionada como uma das metodologias de verificação de adsorção, por ser uma técnica usualmente empregada para confirmar a eficiência de complexação entre os componentes (AYDIN *et al.*, 2022, PUGSLEY *et al.*, 2022). O ensaio foi conduzido em gel de agarose, preparado com brometo de etídio, um agente que se intercala entre os pares de bases de ácidos nucleicos como o DNA e RNA dupla fita. Embora apresente menos sensibilidade para RNA simples fita, este composto também é usado. A intercalação permite que a

migração do RNA seja visualizada sob exposição à luz UV (PUGSLEY *et al.*, 2022). O gel foi submetido a uma diferença de potencial de 70 V. Em condições normais, moléculas de ácidos nucleicos migram em direção ao polo positivo, devido à sua carga negativa. No entanto, quando o RNA se encontra adsorvido a uma superfície polimérica, a hipótese é que o complexo apresenta padrão de migração mais lento, podendo ficar retido no poço de aplicação, o que indicaria uma formação estável.

O ensaio de eletroforese (Figura 10) foi conduzido com a seguinte disposição dos poços no gel: o poço (1) (Padrão) continha o marcador de DNA (100 pb), essencial para estabelecer a referência de migração no gel; o poço (2) (RNA *naked*) serviu como controle negativo de adsorção, contendo o RNA de levedura livre, onde se esperava a migração completa da banda de ácido nucleico em direção ao polo positivo; o poço (3) (NP *naked*) continha apenas o polímero carreador, sendo um controle para verificar a migração intrínseca do nanoparticulado; já os poços (4) e (5) (Ads) representam os resultados da complexação RNA-Polímero em diferentes eficiências de adsorção.

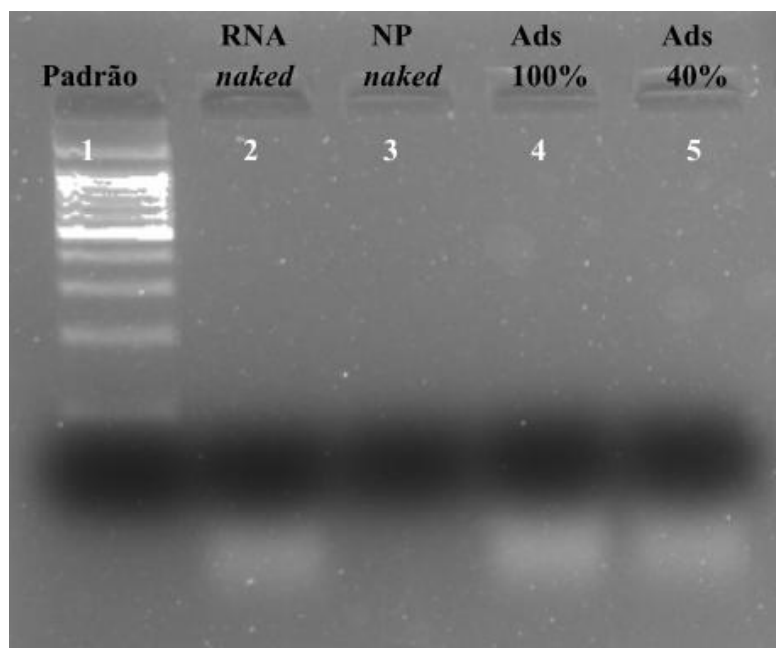


Figura 10. Ensaio de Eletroforese em Gel de Agarose para Avaliação da Complexação de RNA a NP de PEG-PCL-Mal. A imagem apresenta o perfil de migração eletroforética sob luz ultravioleta. A canaleta (1) contém o marcador de massa molecular (100 pb). A canaleta (2) apresenta o RNA livre (*naked*), evidenciando a migração em direção ao polo positivo. A canaleta (3) contém as nanopartículas puras (*naked*). As canaletas (4) e (5) representam o ensaio de adsorção em diferentes condições de saturação calculadas (100% e 40%, respectivamente).

Se fosse possível verificar a adsorção por essa metodologia, haveria dois resultados distintos. O poço (4) (Ads 100%) ilustra a complexação ideal, onde a retenção total da banda no poço indicaria que 100% do RNA está firmemente adsorvido ao polímero. Em contraste, o poço (5) (Ads 40%) ilustra uma complexação parcial, onde 40% do RNA está adsorvido, o que poderia resultar no aparecimento de uma banda migratória no gel, que corresponderia ao RNA livre (não adsorvido).

Contrariamente ao que se esperava, não foi observada a retenção do RNA quando complexado ao polímero uma vez que o gel foi submetido à diferença de potencial. No poço (4), notou-se que o padrão de migração do RNA foi o mesmo que o RNA livre (poço 2). Esse resultado sugere que ocorreu a liberação do ácido nucleico da superfície do polímero mediante aplicação do campo elétrico, permitindo sua migração no gel. Diante dessa observação, o ensaio de eletroforese mostrou-se, nesta etapa, inconclusivo para a comprovação da complexação sob influência de campo elétrico. A migração observada indica que a força eletromotriz aplicada pode ter superado as interações entre o RNA e a superfície de maleimida, ou que as condições do tampão de corrida interferiram na manutenção da ligação. Portanto, faz-se

necessária a inclusão das amostras com o recobrimento polimérico (PLA e HA), que teoricamente conferem uma proteção adicional e física contra o desprendimento da carga genética.

4.2.2 Modelagem Matemática e Análise dos Parâmetros de Adsorção

Para uma compreensão aprofundada da interação físico-química entre as nanopartículas de PEG-PCL-Maleimida e o RNA, os dados experimentais de potencial zeta foram submetidos a um ajuste de modelos matemáticos através do *software* OriginPro®. A modelagem matemática constitui uma ferramenta indispensável em estudos de interfaces coloidais, pois permite converter variações experimentais de carga superficial em parâmetros quantitativos, como a afinidade de ligação e a capacidade de saturação da interface. Esses parâmetros são fundamentais para o *design* racional de nanovetores, pois permitem prever o comportamento do sistema em diferentes razões de massa e identificar os limites termodinâmicos que governam a estabilidade do complexo. Neste estudo, foram comparadas duas abordagens distintas: o modelo de Langmuir na forma exponencial e o modelo sigmoidal do tipo Dose-Resposta (Hill). Os parâmetros estatísticos e físico-químicos extraídos de ambos os modelos testados estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros estatísticos e físico-químicos obtidos pelos modelos de Langmuir Exponencial e Sigmoidal.

Parâmetro	Modelo de Langmuir (Exponencial)	Modelo Sigmoidal (Dose-Resposta)
Equação	$y = A_0 + A_1 \cdot e^{-b \cdot m}$	$y = A_1 + \frac{(A_2 - A_1)}{1 + 10((\log x_0 - x) \cdot p)}$
Platô Inicial (mV)	-9,3(calculado via A0 +A1)	-9,0 (fixado experimentalmente)
Platô Final (mV)	-54,0±106,9 (A0)	-19,0 ±0,7 (A1)
Afinidade / Inflexão	0,8±2,3 (b)	0,126±0 (log x0)
Coef. Hill (p)	---	-10,6±1,9
R ² Ajustado	0,99	0,96

O modelo de Langmuir fundamenta-se na suposição de que a adsorção ocorre sobre uma superfície homogênea, formando uma monocamada em um número finito de sítios equivalentes e independentes (SWENSON; STADIE, 2019). Embora essas hipóteses sejam simplificadas, desconsiderando interações laterais e heterogeneidades superficiais, o modelo “captura a física essencial” dos fenômenos interfaciais e constitui uma base conceitual sólida para extensões mais complexas, como os modelos cooperativos ou multissítio (ZHU *et al.*, 2017). Em sistemas envolvendo ácidos nucleicos, o modelo de Langmuir é amplamente reconhecido como ponto de partida adequado, reproduzindo o comportamento de saturação típico observado em superfícies como ouro, sílica, polímeros condutores e matrizes cromatográficas (BAG *et al.*, 2021).

Aplicado em sua forma de decaimento exponencial, o modelo busca descrever a dinâmica de saturação da interface coloidal por meio de parâmetros que isolam aspectos específicos do processo. Nessa formulação, a variável independente *m* representa a massa de RNA adicionada em relação a uma massa fixa de nanopartículas (razão mg RNA : 1 mg NP), atuando como variável motriz da resposta. O parâmetro A₁ define a amplitude do processo, isto é, a variação total do potencial zeta atribuída

à adsorção; somado a A_0 , permite extrapolar o potencial zeta da nanopartícula desnuda ($m = 0$), que no ajuste correspondeu a $-9,30$ mV, em concordância com o valor experimental. O coeficiente b representa a constante de afinidade aparente, expressando a rapidez com que o equilíbrio de saturação é atingido: o valor de $b = 0,846$ indica interações atrativas significativas entre o RNA e os grupos funcionais da superfície, governando a curvatura inicial da queda de potencial.

Conforme apresentado na Tabela 3, o modelo de Langmuir exibiu um ajuste estatístico satisfatório ($R^2 = 0,99$). Entretanto, a análise física mostra que o parâmetro de equilíbrio $A_0 = -54,0 \pm 106,9$ mV assume um caráter teórico, representando o potencial zeta em uma condição ideal de saturação da monocamada. Esse valor excede os limites observados experimentalmente, o que sugere que o modelo, embora matematicamente preciso, não contempla as restrições físicas reais de empacotamento molecular, como as repulsões eletrostáticas laterais e o impedimento estérico imposto pelas cadeias de PEG (JACKSON *et al.*, 2017).

A Figura 11 ilustra o ajuste do modelo de Langmuir exponencial aos dados experimentais de potencial zeta. A curva vermelha mostra a correlação quase ideal com os pontos experimentais, descrevendo de forma acurada a cinética inicial de queda do potencial (regida por A_1 e b). Contudo, observa-se que o modelo projeta um platô de saturação excessivamente negativo, indicando que a hipótese de monocamada ideal extrapola as condições reais da interface micelar.

Dessa forma, embora o modelo de Langmuir exponencial descreva adequadamente o regime inicial de decaimento do potencial zeta, sua limitação em representar transições cooperativas e não lineares motivou o emprego de um modelo alternativo, o modelo sigmoidal do tipo dose-resposta (Hill). Este modelo constitui uma extensão natural da abordagem de Langmuir, sendo particularmente adequado para sistemas em que a adsorção ocorre em múltiplas etapas ou apresenta dependência entre os sítios de ligação (WANG *et al.*, 2024).

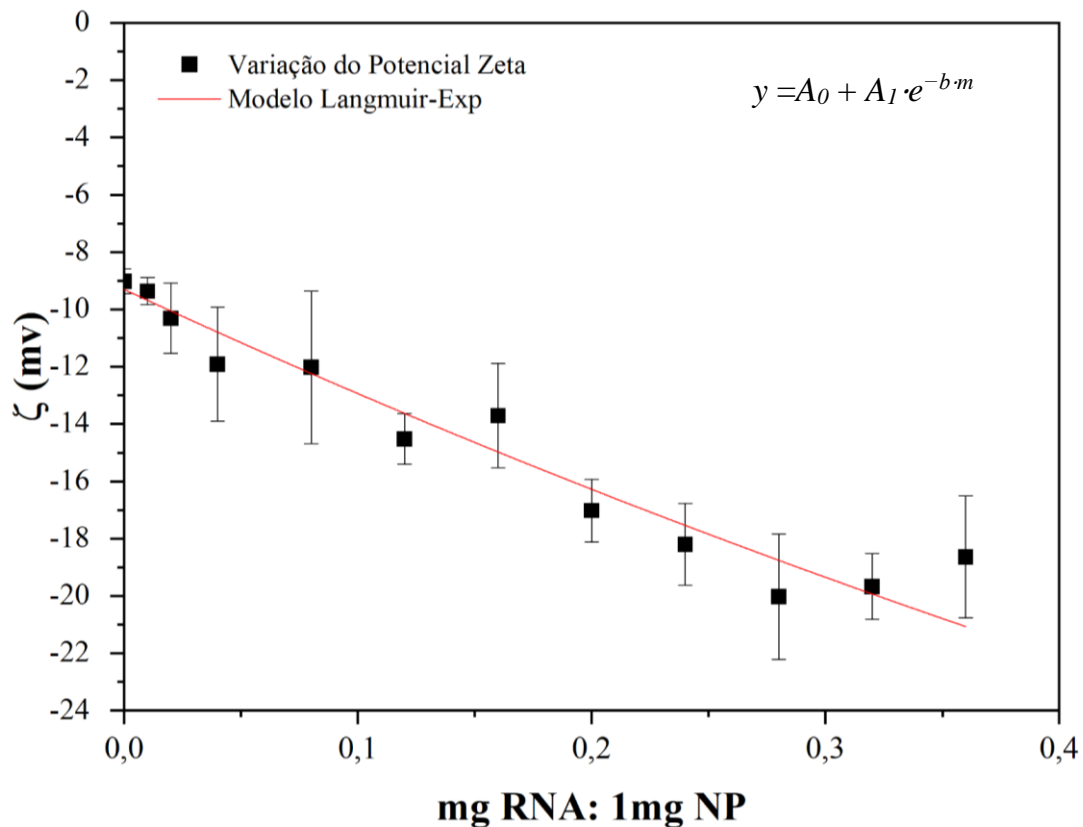


Figura 11. Ajuste dos dados experimentais de potencial zeta ao modelo de Langmuir Exponencial. A curva vermelha representa o ajuste matemático do modelo, demonstrando uma correlação estatística quase ideal com os pontos experimentais. Nota-se que o modelo captura com precisão a cinética inicial de queda do potencial (regida pelos parâmetros A_1 e b), porém projeta um platô de saturação (A_0) em valores excessivamente negativos, evidenciando que a monocamada teórica de Langmuir extrapola as restrições físicas reais de empacotamento molecular na interface micelar.

No presente estudo, a relação entre o potencial zeta e a quantidade de RNA adicionada às nanopartículas de PEG-PCL-Maleimida apresentou um perfil sigmoide característico, sugerindo uma transição gradual entre estados de superfície com diferentes densidades de carga.

Exposto na Tabela 3, na coluna referente ao modelo sigmoide, o parâmetro A_2 , fixado experimentalmente em $-9,0$ mV, representa o limite superior da resposta, correspondendo ao potencial inicial da nanopartícula desnuda e garantindo que o modelo partisse de um valor físico real (GOROHOVS; DEKHTYAR, 2025). Já o parâmetro A_1 , obtido em $-19,0 \pm 0,7$ mV, define o platô inferior da curva, ou seja, o potencial zeta final alcançado após a saturação da interface com RNA. Diferentemente

do comportamento teórico previsto pelo modelo de Langmuir, descrito na Tabela 3, este valor apresenta concordância direta com os dados experimentais, refletindo a saturação eletrostática efetiva da superfície antes da formação de uma monocamada ideal (GILBERT *et al.*, 2024).

O parâmetro x_0 , determinado em 0,126 mg RNA/mg NP (Tabela 3), corresponde ao ponto de inflexão da curva, análogo à constante EC_{50} em modelos farmacológicos, e representa a condição de meia-neutralização de carga na interface coloidal, interpretação consistente com o uso clássico de modelos de Hill/dose-resposta em toxicologia e fisicoquímica de adsorção cooperativa. Este ponto indica a proporção de RNA necessária para atingir metade da variação total do potencial, sendo um marcador direto da capacidade efetiva de recobrimento da nanopartícula (GILBERT *et al.*, 2024).

Por fim, o coeficiente de Hill (p), obtido como $-10,6 \pm 1,9$, quantifica o grau de cooperatividade do processo de adsorção. Seu valor elevado de sugere uma adsorção fortemente cooperativa, na qual a ligação inicial de moléculas de RNA induz rearranjos conformacionais na corona polimérica, aumentando a densidade local de carga e favorecendo a adsorção subsequente até o limite de saturação (GILBERT *et al.*, 2024).

A Figura 12 a seguir ilustra o ajuste dos dados experimentais de potencial zeta ao modelo sigmoidal do tipo dose-resposta, conforme parâmetros da Tabela 3.

Observa-se que a curva ajustada descreve de forma fiel a transição cooperativa da carga superficial, destacando o ponto de inflexão (x_0) e a estabilização em um platô final de $-19,0$ mV. O modelo reproduz com precisão a variação experimental, evidenciando três regimes de comportamento distintos: (i) uma fase inicial de pré-adsorção, correspondente à ocupação parcial dos sítios catiônicos disponíveis uma vez que há a funcionalização da NP com a maleimida; (ii) uma região de transição acentuada, associada à reorganização cooperativa da camada superficial; e (iii) um platô final, indicativo da saturação eletrostática efetiva e da estabilização coloidal do sistema (KOOPAL; AVENA, 2001).

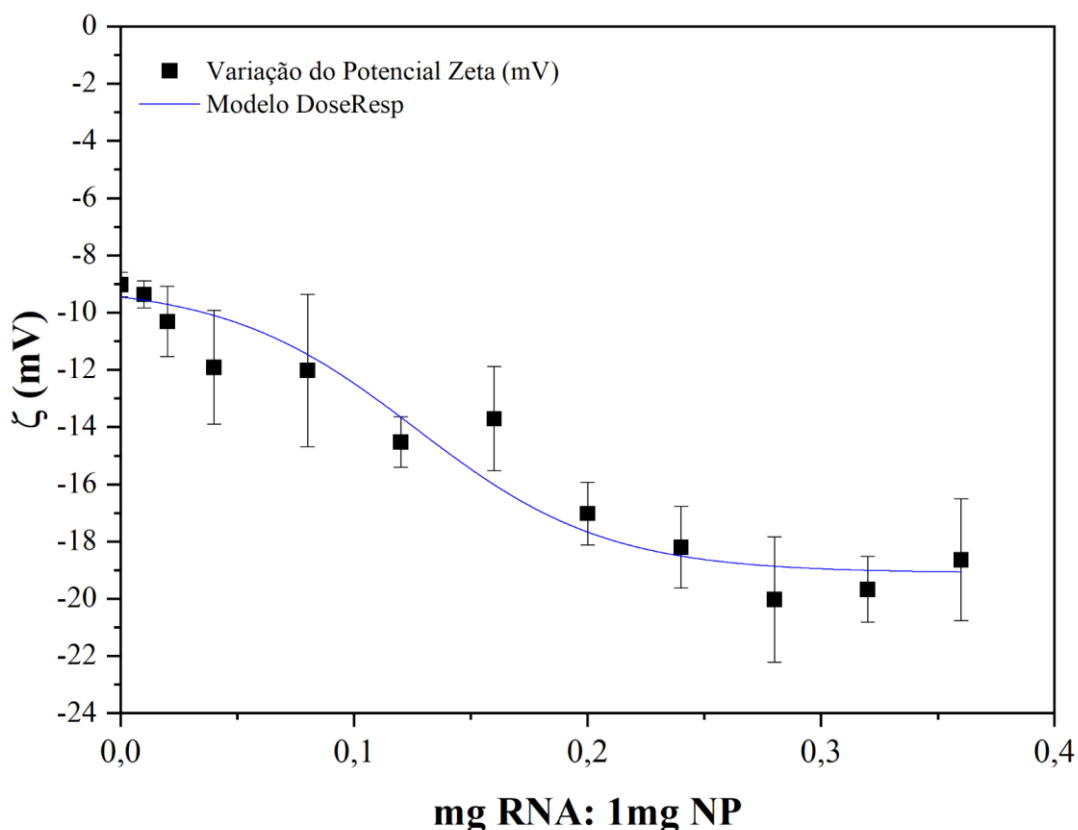


Figura 12. Ajuste dos dados experimentais de potencial zeta ao modelo Sigmoidal Dose-Resposta. A curva azul representa o ajuste matemático do modelo de Hill, evidenciando correlação com os pontos experimentais. Observa-se que o modelo descreve com precisão a transição cooperativa da carga superficial, reproduzindo o comportamento sigmoideal característico da adsorção de RNA. O ponto de inflexão ($x_0 = 0,126$ mg RNA/mg NP) marca a condição de meia-neutralização de carga, enquanto o platô final ($A_1 = -19,09 \pm 0,70$ mV) indica a saturação eletrostática efetiva da interface coloidal. Diferentemente do modelo de Langmuir, o ajuste sigmoideal reflete de forma mais realista o equilíbrio físico do sistema.

Dessa forma, o modelo de Hill fornece uma descrição físico-química mais abrangente e realisticamente compatível com o comportamento experimental observado, capturando fenômenos de cooperatividade e reorganização interfacial que extrapolam as previsões do modelo de Langmuir (ZHANG, 2019).

4.3. Montagem Multicamada e Internalização Celular

4.3.1. Efeito do Recobrimento nas Propriedades das NPs

A validação do recobrimento com PLA foi realizada por meio do monitoramento da inversão do potencial zeta e da variação no diâmetro hidrodinâmico,

parâmetros amplamente utilizados como indicadores da formação e saturação de camadas Lbl. Revestimentos multicamadas com polieletrólitos são rotineiramente avaliados por essa inversão de carga, que sinaliza a troca do polímero dominante na interface e a compensação eletrostática entre as camadas (CARO-LEÓN *et al.*, 2025). Para este ensaio inicial, utilizou-se a menor carga de RNA testada (0,005mg RNA : 1mg NP), visto que o foco era validar a arquitetura dos recobrimentos e não a capacidade máxima de carregamento, etapa prevista para ensaios futuros com formulações mais concentradas. Assim, foi adotada a proporção mássica de 1 mg NP : 0,2 mg PLA, valor fundamentado em protocolos descritos para sistemas análogos, nos quais quantidades reduzidas de polieletrólito se mostraram suficientes para atingir o ponto de inversão de carga sem gerar excesso de polímero livre, preservando a estabilidade coloidal e o controle estequiométrico da superfície (MÉNDEZ; LÓPEZ, 2020; CARO-LEÓN *et al.*, 2025). Os resultados obtidos para esta formulação estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação de Potencial Zeta da NP antes e após o recobrimento com PLA

	Potencial Zeta médio (mV)	Desvio padrão	DPR%
NP-RNA	-9,3	0,4	5,0%
NP-RNA-PLA	+15,8	2,4	15,7%

A mudança do potencial zeta de $-9,3$ mV para $+15,8$ mV após a deposição de PLA evidencia a inversão eletrostática característica da etapa de recobrimento catiônico, confirmando a formação de uma camada superficial contínua e funcional. O predomínio de cargas positivas, atribuídas aos grupos guanidínio da PLA, indica estabilização coloidal eficiente e preparo adequado das nanopartículas para a etapa subsequente de deposição do ácido hialurônico.

A análise por DLS demonstrou que as NPs mantiveram o tamanho em escala nanométrica, porém revelou a importância do pré-tratamento para a homogeneidade do sistema. Nas amostras brutas (quadrados chumbo, Figura 13), o perfil polidisperso apresentou um pico principal entre 50 e 60 nm, próximo ao núcleo original (72,6 nm), mas com picos secundários acima de 200 nm sugerindo agregados transitórios ou cadeias de polieletrólito não adsorvidas. A presença de picos secundários e ombros

acima de 200 nm, contudo, sugere a coexistência de duas populações: uma de nanopartículas individuais e uma de agregados transitórios, possivelmente associados a cadeias de polieletrólito não adsorvidas. Essa heterogeneidade inicial, contrastada pela preservação de uma população majoritária no tamanho alvo, sugere que o recobrimento é capaz de produzir NPs no tamanho necessário, contudo, evidencia a necessidade de pré-tratamentos de refino físico, como a filtração em membranas de 0,22 μm , recomendada para eliminar subpopulações e estabilizar a dispersão (KIM *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2022).

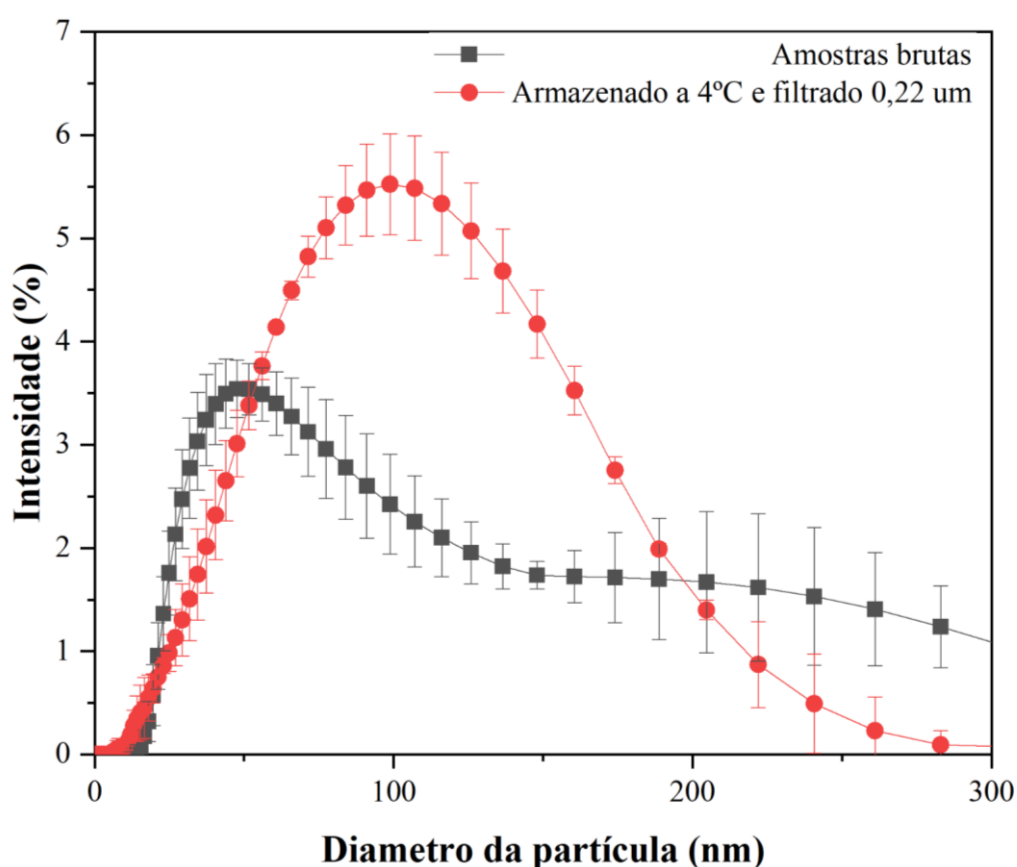


Figura 13. Distribuição de tamanho por intensidade das NP-RNA-PLA antes e após o refino físico. Os quadrados cinzas representam a amostra bruta (fresca e sem pré-tratamento), evidenciando um perfil polidisperso com a presença de agregados ou polieletrólitos livres. Os círculos vermelhos ilustram o sistema após o armazenamento a 4 °C e filtração em membrana de 0,22 μm , demonstrando a transição para um perfil monomodal, com diâmetro hidrodinâmico estabilizado e adequado para a funcionalização subsequente. As barras de erro indicam o desvio padrão entre três leituras independentes.

Com base nessas observações, procedeu-se a uma nova etapa de caracterização após um período de repouso de 24 horas a 4 °C, seguida por filtração em membrana

de polietersulfona (PES) de 0,22 μm . O perfil resultante evidenciou um deslocamento expressivo da intensidade de espalhamento para a faixa nanométrica de interesse, conforme ilustrado na Figura 13 pela curva composta por círculos vermelhos, confirmando a obtenção de um sistema predominantemente monomodal e homogêneo. A estabilização do diâmetro hidrodinâmico médio em patamares próximos a 100 nm após o refino físico não apenas valida a integridade estrutural das nanopartículas recobertas com PLA, como também assegura a reprodutibilidade necessária para a deposição subsequente da camada de ácido hialurônico.

É fundamental destacar que, em todas essas modificações e condições de armazenamento, o potencial zeta do sistema demonstrou uma estabilidade notável, mantendo-se consistentemente na faixa de +15 mV. Essa constância na densidade de carga superficial, mesmo diante dos tratamentos visando ao refinamento da amostra, confirma que a inversão de carga promovida pela PLA é robusta e que a interface catiônica tende a permanecer preservada ao longo do tempo.

Após a consolidação do sistema intermediário catiônico, procedeu-se à deposição da camada externa de ácido hialurônico, empregando metodologia semelhante baseada em interações eletrostáticas sequenciais. Essa etapa é fundamental para conferir ao nanovetor uma interface aniônica biocompatível, capaz de reconhecer e interagir especificamente com receptores celulares, como o CD44, amplamente expresso em células leucêmicas (QIAN *et al.*, 2024; SINANI *et al.*, 2023). A progressão da montagem foi monitorada por meio da variação do potencial zeta em função do incremento da razão mássica de HA, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Acompanhamento da carga superficial da NP-RNA-PLA-HA em diferentes razões de HA

	Potencial Zeta médio (mV)	Desvio padrão	DPR%
NP-RNA-PLA	+15,8	2,4	15,7%
NP-RNA-PLA-1HA	+ 17,9	1,6	9,0%
NP-RNA-PLA-2HA	+10,2	0,4	4,1%
NP-RNA-PLA-5HA	- 10, 7	0,1	1,7%

A análise dos dados mostra que a adição inicial de HA na proporção 1:1 (NP–RNA–PLA–1HA) não promoveu a inversão da carga superficial, mantendo o sistema fortemente catiônico (+17,9 mV). Esse resultado sugere que, nessa concentração, o poliânion atua predominantemente no recobrimento parcial da camada de PLA, sem atingir o ponto de compensação eletrostática necessário ao recobrimento completo. Com o aumento da proporção para 2:1 (NP–RNA–PLA–2HA), observou-se uma redução significativa do potencial zeta para +10,2 mV, indicando o início da neutralização parcial das cargas positivas provenientes dos grupos guanidínio da poli(L-arginina). A inversão efetiva da polaridade superficial foi atingida apenas na razão 5:1 (NP–RNA–PLA–5HA), na qual o sistema apresentou potencial zeta negativo (-10,7 mV). Essa transição para o estado aniônico constitui a evidência físico-química da formação da camada externa de HA, confirmando o estabelecimento da arquitetura multicamada final e a estabilização coloidal do sistema.

É importante notar que, à medida que a densidade de HA na superfície aumenta, o DPR% apresenta uma redução progressiva, decrescendo de 15,7% no sistema intermediário para 1,7% na formulação final. Essa tendência pode indicar que o recobrimento com HA, além de promover a inversão da carga superficial, contribui para a homogeneização e estabilização coloidal do sistema, refletindo maior uniformidade das nanopartículas e reprodutibilidade do processo. O diâmetro hidrodinâmico obtido nesta etapa, aliado à carga negativa estável, posiciona o nanovetor como uma plataforma promissora para estudos de internalização celular e silenciamento gênico.

A Tabela 6 sumariza a evolução do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico em cada etapa do recobrimento, desde a NP estabilizada apenas com P407 até a formulação final recoberta com HA. Contudo, a análise da distribuição de tamanho para o sistema final revelou um deslocamento expressivo, com populações atingindo valores superiores a 200 nm, o que elevou o diâmetro médio da amostra para 167 nm. Esse aumento é consistente com dois efeitos relatados em sistemas polieletrólito–nanopartícula, particularmente em montagens *LbL*: (i) a passagem pelo ponto de neutralização de carga ($\zeta \approx 0$), na qual as forças repulsivas eletrostáticas são minimizadas e as interações de Van der Waals passam a dominar, promovendo agregação transitória; e (ii) o fenômeno de *bridging*, no qual cadeias longas de HA parcialmente adsorvidas conectam mais de uma nanopartícula, favorecendo a

formação de aglomerados antes da completa sobrecarga aniônica. Situação análoga é descrita em sistemas de *layered double hydroxides* (LDH) e em nanopartículas metálicas recobertas por polieletrólitos, nos quais a instabilidade coloidal é observada justamente ao atravessar o ponto isoelétrico, gerando aumento de tamanho por agregação parcial (SOMOSI *et al.*, 2018; VÁSÁRHELYI *et al.*, 2021).

Tabela 6. Monitoramento do potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico médio durante a montagem LbL

	Potencial Zeta médio (mV)	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)
NP	-10,4 ± 0,6	72,6 ± 12,2
NP-RNA	-9,7 ± 0,6	83 ± 9,9
NP-RNA-PLA	+15,8 ± 2,4	69,8 ± 15,4
NP-RNA-PLA-5HA	- 10, 7 ± 0,1	167,7 ± 5,2

Curiosamente, esse comportamento não foi observado nas formulações intermediárias (NP pura ou NP-RNA), nas quais as interações do sistema vigente foram suficientes para a manutenção da aparente estabilidade coloidal. Esse contraste sugere que a instabilidade observada é induzida especificamente pela etapa de recobrimento com ácido hialurônico, durante a qual ocorre a neutralização parcial da superfície. Em sistemas LbL, esse evento é frequentemente associado à formação de domínios heterogêneos de carga, conhecidos como *patch charges*, resultantes da adsorção incompleta de cadeias poliméricas (SZERLAUTH; MURÁTH; SZILAGYI, 2020). Esses domínios promovem atrações direcionais entre regiões de carga oposta em nanopartículas distintas, facilitando a agregação mesmo quando o potencial zeta médio ainda indica estabilidade aparente.

Esse comportamento também foi relatado em sistemas coloidais recobertos com polieletrólitos aniônicos, como poliacrilato e heparina, nos quais a coexistência de regiões catiônicas residuais e segmentos aniônicos livres gera uma superfície eletricamente heterogênea, propensa a interações entre partículas (PAVLOVIC *et al.*,

2016; MEN *et al.*, 2020). Assim, é plausível que o padrão de agregação observado na formulação NP–RNA–PLA–5HA decorra desse efeito de *patch charge* combinado ao *bridging*, caracterizando uma zona de neutralização na qual a cobertura incompleta por HA reduz temporariamente a repulsão eletrostática e favorece associações transitórias entre partículas.

Em síntese, os resultados confirmam a viabilidade da estratégia LbL para a construção de nanopartículas multicamadas, demonstrando controle sobre a carga superficial e a organização interfacial. No que se refere ao diâmetro hidrodinâmico médio das etapas intermediárias, uma análise considerando a sobreposição dos desvios padrão indica que as formulações se mantiveram em uma faixa de tamanho equivalente, sugerindo que as variações dimensionais foram sutis até a etapa final. Entretanto, a etapa de recobrimento com ácido hialurônico apresentou instabilidade coloidal, possivelmente relacionada à neutralização parcial da carga e à formação de domínios heterogêneos de superfície e *bridging* entre partículas. Esse comportamento, amplamente relatado em sistemas LbL, resulta na perda temporária de monodispersidade e aumento do diâmetro médio, caracterizando uma fase transitória antes da completa sobrecarga aniônica e reestabilização da dispersão. Portanto, etapas futuras deverão concentrar-se na otimização da deposição de HA, ajustando razão mássica, taxa de adição, tempo de estabilização e condições de esterilidade de síntese, de modo a minimizar agregações transitórias, preservar dimensões sub-100 nm e assegurar a reprodutibilidade do nanovetor.

4.3.2. Análise da Internalização Celular

A avaliação da performance biológica das nanopartículas, por meio de ensaios de internalização em linhagens celulares Jurkat e MOLT-4, constitui uma etapa fundamental para a validação da funcionalidade do nanovetor desenvolvido. A execução desses ensaios justifica-se pela necessidade de quantificar a eficiência de captação celular, bem como de verificar a capacidade da nanoestrutura em transpor barreiras biológicas e promover a entrega intracelular do material genético. Nesse contexto, a citometria de fluxo apresenta-se como uma ferramenta útil, uma vez que, desde sua introdução na década de 1960, consolidou-se como uma das metodologias mais robustas da pesquisa biomédica, permitindo a análise multiparamétrica e quantitativa de propriedades celulares em nível de célula única (LI *et al.*, 2021).

Nessa abordagem experimental, o processo de internalização das nanopartículas é monitorado por meio do uso de siRNA conjugado ao fluoróforo FAM™, que atua como uma sonda molecular fluorescente. À medida em que há a internalização do complexo, seja na arquitetura multicamada final (NP-siRNA-PLA-HA) ou em formulações intermediárias, a fluorescência emitida pode ser detectada e quantificada por citometria de fluxo. O aumento da intensidade de fluorescência observado nas populações celulares incubadas com as NPs contendo o agente fluorescente, quando comparado ao controle negativo, idealmente constituído por células tratadas com nanopartículas não fluorescentes, é interpretado como evidência direta da eficácia do nanovetor enquanto sistema carreador (HEIDARI *et al.*, 2021).

Dando continuidade às análises, o foco experimental concentrou-se na avaliação da cinética de internalização da estrutura final em células Jurkat após períodos de incubação de 4 e 24 horas. O processamento dos dados iniciou-se pela estratégia de *gating*, essencial para a exclusão de detritos e seleção da população de interesse. Inicialmente, as células do grupo controle foram delimitadas em gráficos de dispersão baseados nos parâmetros *forward scatter* (FSC-A) e *side scatter* (SSC-A). Enquanto o FSC-A correlaciona-se ao tamanho celular, o SSC-A mensura a dispersão de luz lateral em um ângulo de 90°, refletindo a complexidade interna e a granularidade da célula. Essa estratégia possibilita o isolamento da população de células com membrana mais íntegra, cuja porcentagem foi indicada logo acima do desenho do *gate* (na primeira linha da Figura 17, por exemplo). Essas células são caracterizadas por valores mais elevados de FSC-A e SSC-A, permitindo sua distinção em relação a detritos subcelulares, geralmente associados a valores reduzidos desses parâmetros, decorrentes do preparo das suspensões celulares ou das condições as quais as células foram submetidas (LI *et al.*, 2021). Para cada experimento distinto, a estratégia de *gating* foi estabelecida com base no respectivo grupo controle, garantindo a consistência metodológica necessária para a interpretação dos ensaios de internalização em diferentes tempos de incubação e linhagens celulares.

A partir dessa população selecionada, a captação do siRNA foi observada em *dot plots* relacionando o SSC-A (eixo Y) à intensidade de fluorescência no canal FL1-A (eixo X). Nesta representação, o eixo Y monitora possíveis mudanças na ultraestrutura celular decorrentes do acúmulo citoplasmático das nanopartículas. Simultaneamente, o eixo X mostra a porcentagem de células apresentando

fluorescência verde em relação ao controle, assim como diferentes níveis de sua intensidade (exemplo na na linha inferior dos gráficos agrupados na Figura 14). Como o siRNA está conjugado ao fluoróforo FAM, o deslocamento da população para a direita neste eixo funciona como indicador direto de internalização. Assim, quanto maior a intensidade no canal FL1-A, maior a carga de material fluorescente associada à célula.

Essa correlação permitiu a segmentação do gráfico em quadrantes. O quadrante inferior esquerdo (Q4) agrupa a população negativa, com granularidade basal e ausência de sinal fluorescente. Em contrapartida, o quadrante inferior direito (Q3) identifica as células positivas que efetivamente incorporaram o siRNA marcado sem apresentar alterações estruturais relevantes sob as condições testadas. Dessa forma, os resultados foram organizados em colunas, posicionando os gráficos *SSC vs. FSC* e seus respectivos *SSC vs. FLI* em um alinhamento vertical. Essa disposição estrutural, referida ao longo do texto como *set* de gráficos agrupados, visa facilitar a correlação direta entre o *gate* da população sob análise e intensidade de sinal.

O delineamento experimental foi estruturado em duas etapas principais. Inicialmente, estabeleceram-se as condições fundamentais, como os controles negativos e o controle positivo. Os controles negativos estabelecidos foram: células não tratadas, células incubadas com siRNA FAM™ livre, visando confirmar a incapacidade de transposição da membrana sem o auxílio de um carreador; e células incubadas com nanopartículas puras sem siRNA fluorescente (NP *naked* e NP-P407). Como controle positivo para parâmetro de eficácia, utilizou-se o siRNA FAM™ complexado à Lipofectamina. Os testes iniciais foram feitos com as estruturas experimentais simples representadas pelas NP *naked* + siRNA FAM™ e NP-P407 + siRNA FAM™, com o intuito de comparar a influência do surfactante P407 na estabilidade e captação do sistema. Posteriormente, um novo ensaio foi conduzido para avaliar a arquitetura multicamada completa, replicando as condições de controles e siRNA livre para assegurar a consistência estatística, culminando na análise da plataforma final (NP-P407 + siRNA FAM™ + PLA + HA). Todos os ensaios foram realizados em duas janelas temporais: 4 e 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂.

A análise da interação com a linhagem Jurkat em 4 horas revelou a definição de um *gate* de linfócitos contendo entre 70,3% e 85,4% das células (Figura 14: a-d),

indicando que, mesmo na presença das nanopartículas, a população manteve-se agrupada em sua região característica. Esse perfil morfológico sugere uma toxicidade preliminar favorável, embora a confirmação da biocompatibilidade dependa de testes de viabilidade específicos. Nos gráficos de fluorescência (*SSC vs. FL1*), o controle negativo e as formulações sem marcador concentraram-se no quadrante Q4, atestando a ausência de autofluorescência. No ensaio com o marcador FAMTM (e-g), a população celular preservou as coordenadas morfológicas do controle, com índices no *gate* de 74,6% para a Lipofectamina e entre 72,6% e 83,3% para as formulações nanovetorizadas. A eficiência de internalização pode ser observada na linha inferior desse conjunto de gráficos agrupados (e-g). O controle positivo com Lipofectamina apresentou um deslocamento significativo para o quadrante Q3, atingindo 31,4% de positividade devido à sua capacidade de facilitar a entrada de material genético via endocitose ou fusão (XU; WANG, 2015). Em contrapartida, as nanopartículas simples (f-g) permaneceram no quadrante Q4, com valores residuais de 0,05%.

Jukart – 4h de incubação

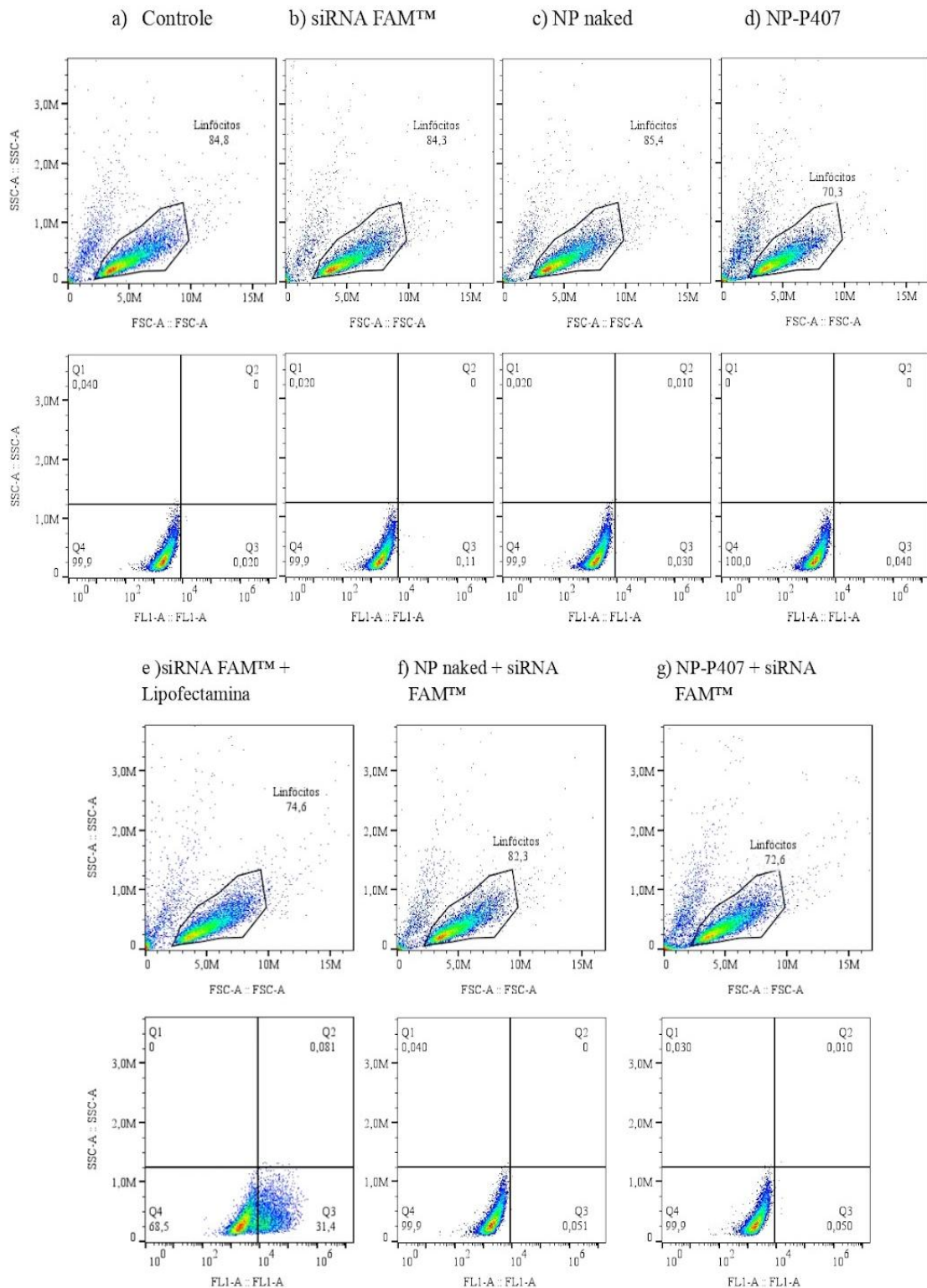


Figura 14. Avaliação por citometria de fluxo da internalização de complexos NP-siRNA em linhagem Jurkat após 4 horas de incubação. Os resultados apresentam a análise comparativa entre os controles e os sistemas nanovetorizados. A linha superior detalha os os parâmetros de dispersão frontal (FSC-A) versus dispersão lateral (SSC-A), com *gates* de linfócitos. A linha inferior exibe os gráficos de pontos

para o canal de fluorescência *FLI-A* (correspondente ao siRNA FAMTM) versus *SSC-A*. As condições apresentadas são: células não tratadas (a) e células incubadas com: siRNA FAMTM isolado (b), NP naked (c), NP-P407 (d), lipofectamina contendo o siRNA FAMTM, representando o controle positivo (e), além das condições de testes NP naked + siRNA FAMTM (f) e NP-P407 + siRNA FAMTM (g). Os dados representam um ensaio único (n=1).

Ao expandir a investigação para a plataforma multicamada com PLA e HA (Figura 15), novamente não foram observadas células fluorescentes para os controles utilizados (células não tratadas e células incubadas com o siRNA livre). Entretanto, detectou-se um sinal de 2,8% no quadrante Q3 para as células incubadas com as nanopartículas (Figura 15d). Embora baixo, esse índice supera os valores das NPs simples, sugerindo que o recobrimento externo pode estar favorecendo uma interação inicial mais robusta com a membrana.

Jukart – 4h de incubação

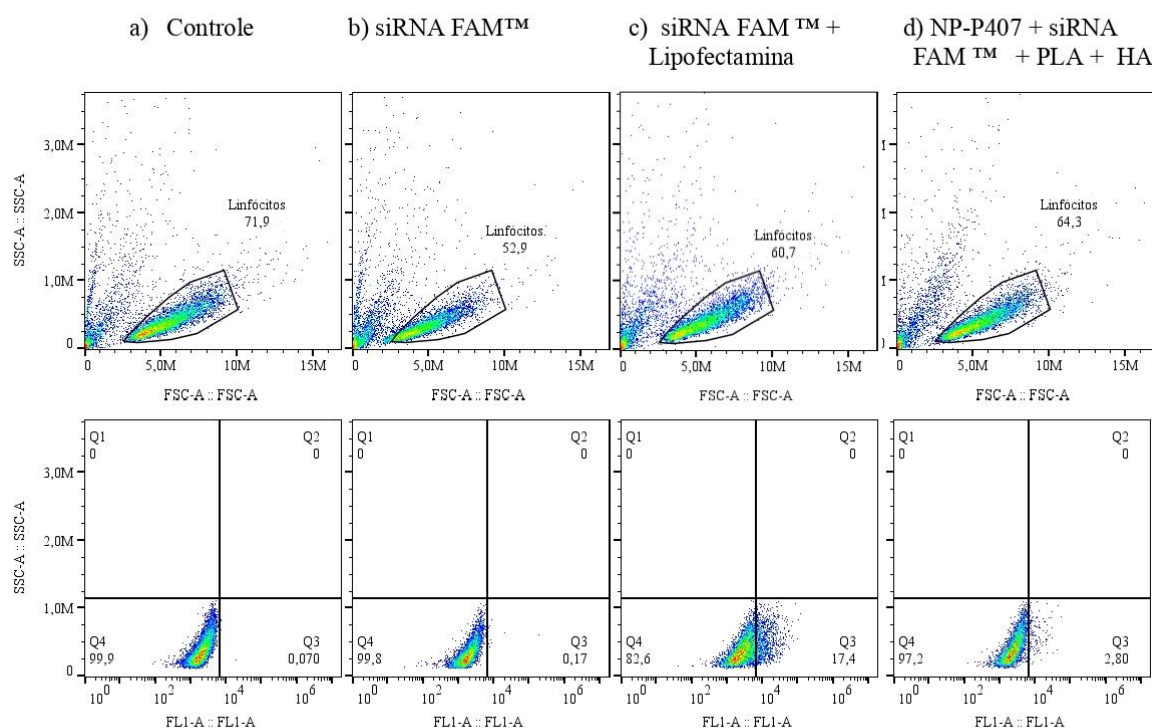


Figura 15. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular da plataforma multicamada em linhagem Jurkat após 4 horas de incubação. Os resultados estão organizados em colunas correspondentes por condição experimental para garantir a rastreabilidade dos dados. A linha superior apresenta a análise dos parâmetros de dispersão frontal (*FSC-A*) versus dispersão lateral (*SSC-A*), evidenciando o *gate* de linfócitos com valores entre 60,7% e 71,9%. A linha inferior exibe a distribuição de fluorescência no canal *FLI-A* versus *SSC-A* para as respectivas amostras: (a) células não tratadas; (b) células incubadas com siRNA FAM™ livre; (c) controle positivo (siRNA FAM™ + Lipofectamina); e (d) células incubadas com a plataforma multicamada completa (NP-P407 + siRNA FAM™ + PLA + HA). Os dados representam um ensaio único (n=1)

Dando prosseguimento à análise para a janela de 24 horas (Figura 16), a dispersão frontal e lateral permaneceu condizente com as células não tratadas, sem alterações na granulose ou tamanho. Os índices de eventos no *gate* referente aos parâmetros *SSC vs FCS* mantiveram-se entre 73,7% a 83,5%, sugerindo que a permanência prolongada dos sistemas não induz à fragmentação celular. A análise de fluorescência confirmou que as NPs sem marcador e o siRNA livre permaneceram no quadrante de negatividade, confirmando que qualquer deslocamento futuro seria fruto

da internalização efetiva mediada pelo nanovetor (HU *et al.*, 2020). No set de nanosistemas simples (e-g), a Lipofectamina manteve sua eficiência (29,5%), enquanto as NPs *naked* e P407 apresentaram níveis residuais no Q3 próximos a 0,04%.

Jukart – 24h de incubação

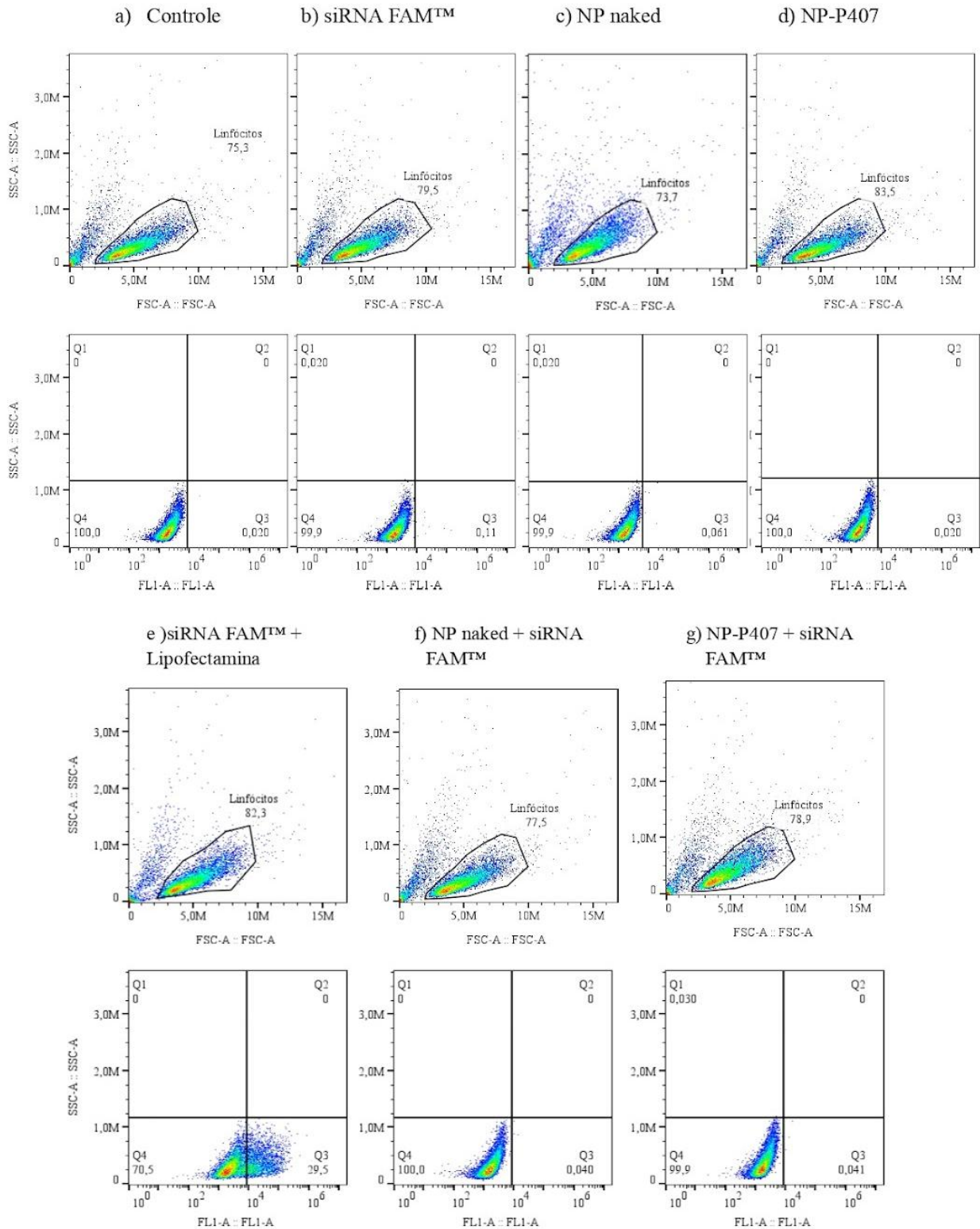


Figura 16. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem Jurkat após 24 horas de incubação. A linha superior (a–d e e–g) apresenta a análise de *FSC-A* vs. *SSC-A*, detalhando o *gate* de linfócitos com manutenção de eventos situados entre 75,5% e 81,1%. A linha inferior correspondente exibe a distribuição de fluorescência (*FL1-A* vs. *SSC-A*) nas seguintes condições: (f)

células incubadas com NP *naked* contendo o siRNA FAMTM e (g) células incubadas com NP-P407 contendo o siRNA FAMTM. Experimento único.

O desfecho da cinética para a arquitetura multicamada completa (Figura 17) mostrou que a maior parte dos eventos permaneceu nos parâmetros de dispersão esperados, com 77,1% da população no *gate*. No entanto, o sinal de 0,25% observado para esta plataforma no quadrante Q3, embora ligeiramente superior ao das NPs simples (0,04%), indica que não houve internalização das nanopartículas frente ao resultado mais expressivo demonstrado pelo controle positivo (15,4%).

Jukart – 24h de incubação

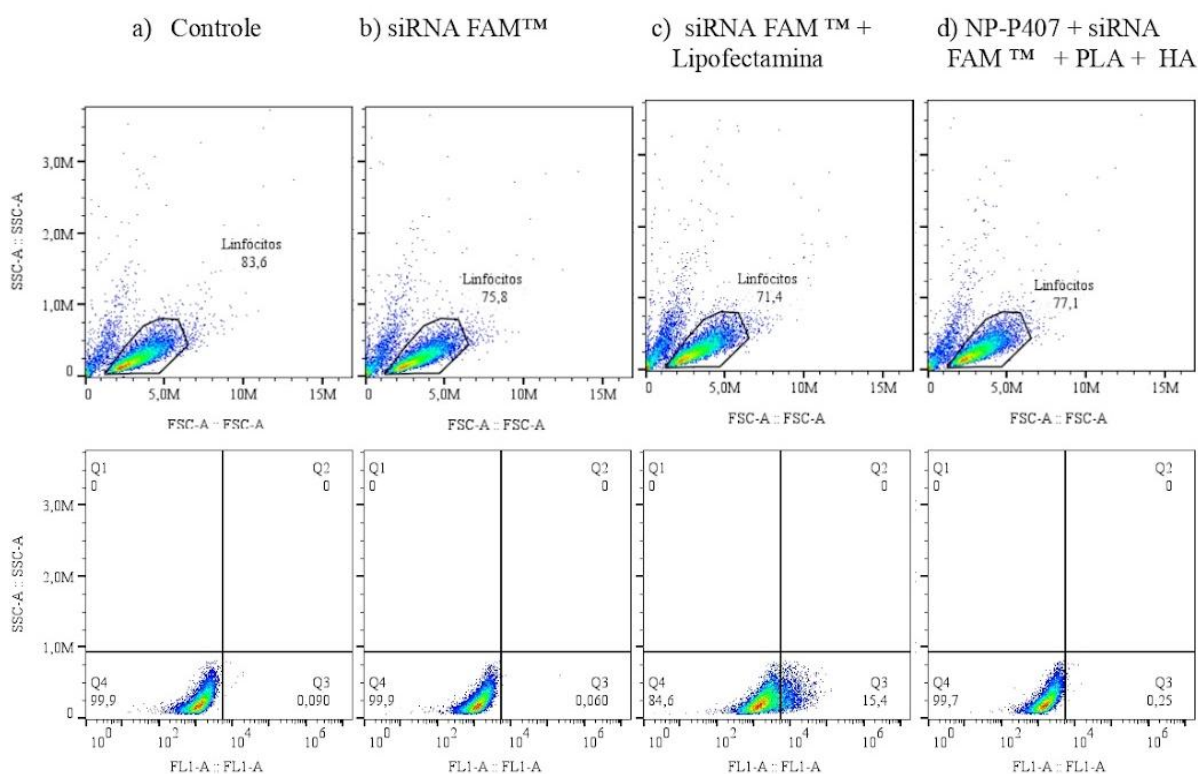


Figura 17. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular da plataforma multicamada em linhagem Jurkat após 24 horas de incubação. A linha superior (a–d) detalha a análise de FSC-A vs. SSC-A, mostrando índice de eventos entre 71,4% e 83,6% da população no *gate* de linfócitos. A linha inferior correspondente exibe os gráficos de pontos para FL1-A vs. SSC-A: controle positivo com Lipofectamina (c) e plataforma multicamada completa (d), composta por NP-P407 + siRNA FAMTM + PLA + HA. Experimento único.

Expandindo o estudo biológico, foi realizada a análise na linhagem MOLT-4 para verificar se o perfil de interação da plataforma se mantinha em diferentes modelos de leucemia de células T. Os resultados após 4 horas de incubação (Figura 18) revelaram, nos gráficos de morfologia (FSC-A vs. SSC-A), uma redução acentuada na proporção de eventos dentro do *gate* em quase todas as condições. Enquanto o controle não tratado (a) apresentou 82,1% de eventos, os grupos siRNA livre (b), NP *naked* (c) e NP-P407 (d) exibiram quedas para 67,6%, 45,1% e 30,1%, respectivamente. Essa suscetibilidade a estresses do protocolo experimental é atribuída à maior sensibilidade biológica da MOLT-4 em comparação à Jurkat (CHI *et al.*, 2022). Contudo, a análise de fluorescência (*FLI-A* vs. *SSC-A*) ratificou a validade do ensaio: os controles não apresentaram sinal positivo, garantindo que qualquer deslocamento das células à direita do gráfico seja atribuído ao marcador FAM. No segundo conjunto de gráficos do mesmo intervalo (e-g), apenas as células incubadas com Lipofectamina (e) apresentaram sinal de fluorescência (21,8%), indicando que as nanopartículas não foram capazes de internalizar o siRNA (f e g).

MOLT-4 – 4h de incubação

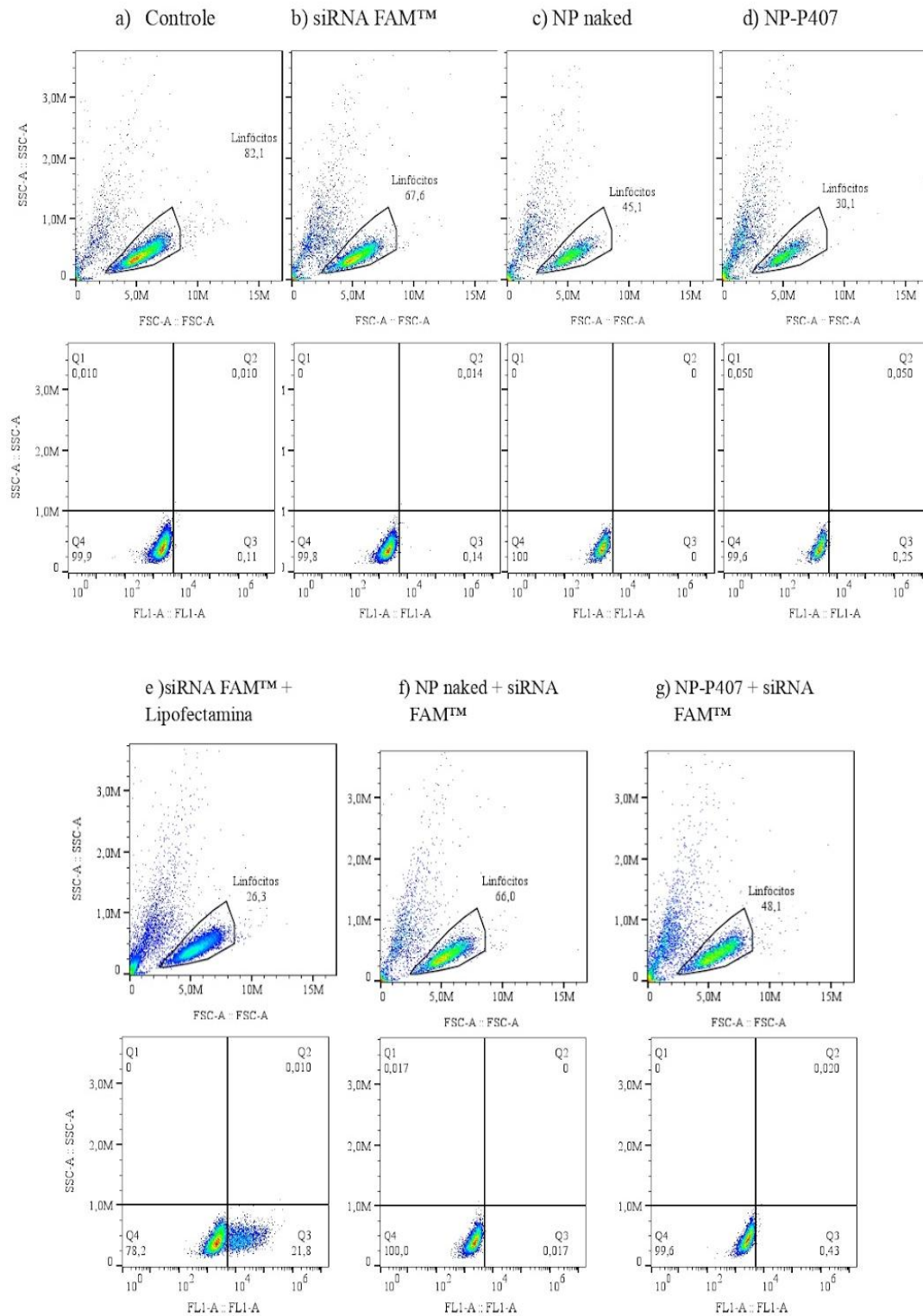


Figura 18. Avaliação por citometria de fluxo da eficiência de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem MOLT-4 após 4 horas de incubação. A linha superior detalha os resultados pelos parâmetros *FSC-A* vs. *SSC-A*, com a retenção de eventos no *gate* variando entre 26,5% (controle positivo) e 81,1%

(controle negativo- células não tratadas). A linha inferior exhibe a distribuição de fluorescência no canal *FLI-A* versus *SSC-A* para as controle de células não tratadas (a) e células incubadas com; siRNA FAM™ livre (b); NP naked (c) ; NP-P407 (d); siRNA FAM™ + Lipofectamina (e); NP *naked* + siRNA FAM™ (f) ; e NP-P407 + siRNA FAM™ (g). Experimento único.

A Figura 19 detalha os resultados após 24 horas. Na linha superior (a-g), observou-se que entre 70% e 80% das células foram agrupadas nesse *gate*, índice mais elevado que o observado em 4h para as células incubadas com as nanopartículas ou o siRNA livre (Figura 18). É possível que após 4h, as células ainda estivessem sensibilizadas pelos tratamentos realizados e que tenham se recuperado ao longo das horas seguintes. Nos gráficos de fluorescência, o controle de células não tratadas (a) e o siRNA livre (b) permaneceram no quadrante de negatividade (Q4), assim como as nanopartículas puras (c e d), que não manifestaram autofluorescência mesmo sob exposição prolongada.

Ao analisar a linha inferior dos conjuntos de gráficos agrupados referentes à internalização no período estendido (e-g), os resultados mostraram que, apesar do controle positivo confirmar a susceptibilidade da linhagem à transfecção (20,8%), as nanopartículas não recobertas foram insuficientes para promover a entrada celular efetiva. Com 99,9% da população confinada ao quadrante Q4, evidenciou-se que a simples adsorção do siRNA ao núcleo polimérico não basta para garantir a internalização na linhagem MOLT-4.

MOLT-4 – 24h de incubação

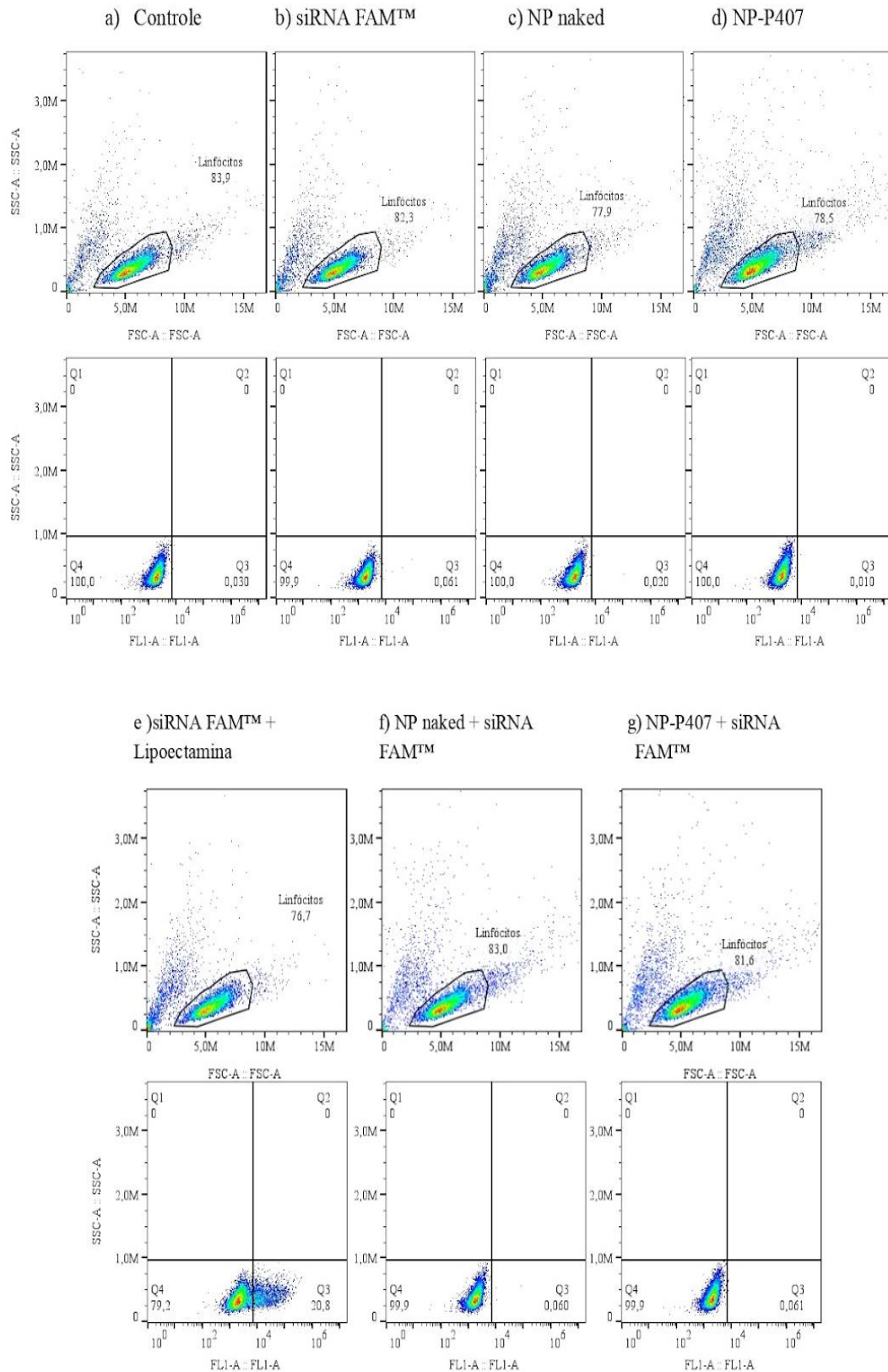


Figura 19. Avaliação da eficiência por citometria de fluxo de internalização celular de complexos NP-siRNA em linhagem MOLT-4 após 24 horas de incubação. A linha superior (FSC-A vs. SSC-A) detalha os *gates* de

linfócitos apresentando índices de eventos entre 76,7% e 83,9%. A linha inferior exibe a distribuição de fluorescência no canal *FLI-A* versus *SSC-A* para as controle de células não tratadas (a) e células incubadas com; siRNA FAM™ livre (b); NP *naked* (c) ; NP-P407 (d); siRNA FAM™ + Lipofectamina (e); NP *naked* + siRNA FAM™ (f); e NP-P407 + siRNA FAM™ (g). Experimento único.

Especificamente para as análises conjuntas das NPs não recobertas com PLA e HA, a baixa detecção de fluorescência intracelular fundamenta-se em dois fatores principais. No primeiro, considera-se uma cinética de captação inerentemente lenta, na qual o período de incubação testado mostrou-se insuficiente para que esses núcleos básicos superassem obstáculos como a formação da coroa proteica em meio de cultura. Esse fenômeno altera a identidade biológica do nanovetor e retarda sua interação direta com a membrana celular (ZHANG; BARZ, 2025; AMAR-LEWIS *et al.*, 2024).

No segundo fator, a estabilidade termodinâmica excessiva desses complexos iniciais atua como um limitante. A forte interação eletrostática entre o siRNA e os domínios catiônicos do núcleo torna a dissociação do sistema a etapa crítica do processo, resultando em uma liberação citosólica ineficiente no intervalo de tempo analisado. Adicionado a isso, a ausência de visualização da fluorescência, representando a internalização dessas partículas, pode ser explicada pela proximidade excessiva entre os fluoróforos na superfície dessas nanopartículas não recobertas, promovendo a supressão de sinal (*quenching*) por transferência de energia não radiativa. Isso dificulta a detecção pelo citômetro mesmo em cenários onde o sistema já tenha iniciado o contato com a célula, uma vez que a intensidade de emissão do marcador FAM™ é drasticamente reduzida enquanto compactada ao carreador (PATEL; IBRAHIM; CHENG, 2021).

Além disso, a permanência da maioria das células tratadas com as diferentes formulações no quadrante de negatividade (Q4) indica que as propriedades dimensionais da plataforma multicamada também exercem um papel restritivo. Como o diâmetro hidrodinâmico após o recobrimento com HA atingiu patamares próximos a 200 nm, pode ter ocorrido um impedimento físico para a entrada nas linhagens linfoides Jurkat e MOLT-4. A literatura aponta que a internalização eficiente nesses modelos costuma ocorrer com diâmetros inferiores a 100 nm, sofrendo quedas drásticas quando o tamanho excede a faixa de 150–200 nm (SANITÀ; CARRESE; LAMBERTI, 2020). Além do fator dimensional, a janela temporal de 24 horas pode ter sido insuficiente para a detecção de um sinal expressivo. Esse cenário corrobora

estudos com polieletrólitos análogos, onde a liberação efetiva do material genético é observada de forma proeminente apenas em períodos superiores a 24 horas (DI SILVIO *et al.*, 2019).

Por outro lado, esses ensaios permitem começar a traçar uma investigação no que se refere ao perfil favorável de biocompatibilidade do sistema. A segurança biológica do núcleo de PEG-PCL-Mal é sustentada por sua natureza biodegradável e citocompatível, sendo a toxicidade desses transportadores poliméricos geralmente considerada desprezível (LIANG *et al.*, 2024; BEHL *et al.*, 2023). Da mesma forma, o uso do surfactante P407 em concentrações moderadas não comprometeu a viabilidade celular, o que é condizente com sua aplicação em blendas poliméricas conforme descrito na literatura (CHI *et al.*, 2022). Embora a estabilidade observada nos gráficos de dispersão sugira que os nanovetores não provocam danos imediatos ou lise celular, esses dados são indicativos e não substituem métodos quantitativos de viabilidade. Assim, para validar definitivamente a citocompatibilidade da plataforma, torna-se essencial a realização de testes complementares, como o ensaio de Iodeto de Propídio (PI) para avaliar a integridade da membrana ou o teste de MTT para mensurar a atividade metabólica celular frente à exposição aos novos nanovetores.

É relevante ressaltar que os ensaios de citometria de fluxo apresentados consistem em experimentos exploratórios únicos, delineados para fornecer uma avaliação preliminar acerca do perfil de internalização celular. Por essa razão, as conclusões e hipóteses discutidas possuem caráter consultivo e pioneiro, carecendo de replicatas experimentais que permitam um tratamento estatístico mais adequado. Tais repetições são fundamentais para corroborar as tendências observadas e consolidar as evidências científicas necessárias para uma conclusão definitiva sobre o desempenho da plataforma multicamada.

CAPÍTULO V: Conclusão

5.1. Conclusões Gerais do Trabalho

O presente estudo permitiu o desenvolvimento e a caracterização detalhada de uma plataforma nanocarreadora baseada em micelas de PEG-PCL-Mal, estruturada via montagem multicamada, voltada ao tratamento da LLA-T. A metodologia de nanoprecipitação demonstrou ser altamente eficiente e reprodutível, consolidando-se como uma técnica de baixo custo e alta precisão para a formação de núcleos poliméricos. A utilização estratégica do surfactante Poloxamer 407 (1% m/v) foi o fator determinante para a estabilização do sistema, possibilitando a obtenção de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico médio de 72,6 nm e baixa polidispersão. As análises de estabilidade temporal confirmaram a robustez da formulação original, que preservou suas dimensões nanométricas e propriedades coloidais por 60 dias sob refrigeração. Embora os dados indiquem uma tendência favorável à estabilidade, este permanece um parâmetro crítico a ser monitorado na formulação final, reforçando a importância de otimizar as condições de estocagem para garantir a integridade do sistema em longo prazo.

Complementarmente à análise dimensional, a caracterização do potencial superficial revelou que as nanopartículas mantêm um perfil eletrocinético estável e predominantemente aniônico em toda a faixa de pH fisiológico e endossômico. A tentativa para a determinação do ponto isoelétrico indicou que a carga líquida nula deve ocorrer em valores de pH inferiores a 2,0, assegurando que, nas condições de aplicação biológica, a superfície micelar apresente carga negativa, o que contribui para a estabilidade coloidal por meio de repulsão eletrostática. Além disso, os ensaios de esterilidade confirmaram a eficácia do protocolo de síntese; a ausência de contaminação microbiana nas amostras produzidas tanto em fluxo laminar quanto em bancada livre validou a assepsia do processo de nanoprecipitação e a viabilidade do uso de solventes orgânicos como agentes limitantes ao crescimento de microrganismos, dispensando tratamentos agressivos que poderiam comprometer a integridade das micelas.

A investigação da interface coloidal permitiu elucidar os mecanismos das interações moleculares entre a coroa micelar e o ácido nucleico. O ajuste matemático

dos dados de potencial zeta ao modelo sigmoidal de Hill revelou que a adsorção do material genético à superfície polimérica ocorre de forma cooperativa ($p = -10,65$). Este resultado sugere que a ligação inicial das moléculas de RNA induz rearranjos conformacionais na coroa micelar que facilitam a deposição de camadas subsequentes, indicando que a malemida desempenha um papel crucial além da simples adsorção física. A construção da arquitetura multicamada foi fisicamente validada pelas sucessivas inversões de carga superficial, onde o potencial zeta transitou de $-9,33$ mV para $+15,8$ mV após a complexação da Poli-L-Arginina, retornando a $-10,71$ mV com o recobrimento final de Ácido Hialurônico. Entretanto, observou-se que a etapa de deposição do HA induziu fenômenos de instabilidade coloidal, como o *bridging* (formação de pontes poliméricas entre partículas) e a distribuição heterogênea de cargas (*patch charges*). Esse comportamento resultou em um aumento do diâmetro hidrodinâmico médio para patamares cerca de 200 nm, sinalizando que a neutralização de carga na interface é um ponto crítico que exige um controle estequiométrico refinado para evitar a aglomeração.

No que tange aos ensaios biológicos, os resultados de citometria de fluxo trouxeram revelações fundamentais sobre a funcionalidade do nanovetor. Enquanto o controle positivo, fundamentado na transfecção por reagente lipídico comercial, validou a metodologia ao demonstrar a internalização efetiva do siRNA com valores variando de 15,4% a 29,5% das células nos intervalos de 4h e 24h, a plataforma multicamada na suas formas intermediárias (NP *naked* e NP+P407) e na final (NP-siRNA-PLA-HA) não apresentou taxas de captação estatisticamente significativas. Este comportamento, no caso da nanopartícula recoberta, sugere que a eficiência de internalização pode estar sendo transitoriamente mitigada pelo diâmetro hidrodinâmico do sistema que ao situar-se em torno de 167 nm após o recobrimento com HA, excede o limite preferencial de 100 nm descrito na literatura para a endocitose eficiente em linhagens linfoides.

Adicionalmente, a possibilidade de uma cinética de captação lenta indicam que janelas de incubação curtas (4h e 24h) podem ser insuficientes para a plena detecção do sinal fluorescente. Portanto, a otimização do diâmetro de partícula, em convergência com a expansão do monitoramento temporal para 48h ou 72h, apresenta-se como uma estratégia necessária para viabilizar a entrada celular e avaliar a eficácia desta plataforma carreadora.

Em síntese, o trabalho estabeleceu parâmetros físico-químicos robustos que servem como base para otimizações futuras. O maior desafio para o sucesso da terapia gênica proposta reside no refinamento do recobrimento com HA, visando reduzir o diâmetro final e potencializar a interação membrana-partícula, garantindo que a estabilidade coloidal não ocorra em detrimento da eficiência de transfecção.

5.2. Perspectivas e Trabalhos Futuros

A partir das conclusões obtidas, este trabalho estabelece as bases para uma nova etapa de refinamento tecnológico. As limitações observadas na internalização celular e na estabilidade coloidal do sistema multicamada direcionam os esforços futuros para as seguintes áreas:

- **Refinamento da Arquitetura LbL e Estabilidade Coloidal:** A etapa imediata consiste em otimizar a deposição do Ácido Hialurônico (HA) para resolver o aumento do diâmetro hidrodinâmico. Pretende-se investigar o efeito de diferentes razões de massa entre os componentes (PLA e HA) e o tempo de repouso entre as adições. O objetivo é estabelecer uma condição de recobrimento que impeça a formação de agregados e mantenha a partícula final abaixo de 100 nm, garantindo que o nanovetor permaneça estável para a interação celular.
- **Avaliação da Citotoxicidade e Biocompatibilidade:** Para complementar os dados obtidos por citometria, serão realizados ensaios de viabilidade celular utilizando o corante de exclusão Iodeto de Propídio (PI). Etapa fundamental para validar quantitativamente a biocompatibilidade do sistema e confirmar que a manutenção da integridade biológica, sugerida pela literatura.
- **Transição para o siRNA e Refinamento da Modelagem** O estudo de modelagem matemática, que mostrou o comportamento de adsorção com o RNA de levedura, será agora aplicado ao siRNA autêntico. Será avaliado se o tamanho menor e a estrutura de fita dupla do siRNA alteram a capacidade de carga e a afinidade da superfície da nanopartícula. Essa etapa é essencial para

confirmar se os parâmetros de saturação descobertos com o modelo de levedura se mantêm para o material genético funcional.

- **Engenharia de superfície e direcionamento ativo:** Com a estrutura estabilizada, o foco passará para o aumento da seletividade do sistema por meio da funcionalização com diferentes agentes. Além do Ácido Hialurônico (alvo CD44), serão testados anticorpos e aptâmeros para o reconhecimento de proteínas específicas de células leucêmicas (como a PTK7), além de proteínas diversas que visem melhorar o tempo de circulação e garantir a entrada específica nas células-alvo.

- **Validação da internalização e *knockout* gênico:** Uma vez otimizada a entrada celular nas linhagens Jurkat e MOLT-4, o projeto avançará para os estudos de silenciamento gênico. Partículas carregadas com siRNA validado serão utilizadas para silenciar oncogenes críticos da LLA-T, como o *NOTCH1*, validando a eficácia terapêutica por meio de técnicas de RT-qPCR e Western Blot para confirmar a redução da expressão gênica e proteica.

CAPÍTULO VI: Referências bibliográficas

AGRAWAL, Neema; DASARADHI, P. V. N.; MOHMMED, Asif; *et al.* RNA interference: Biology, mechanism, and applications. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 67, n. 4, p. 657–685, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.67.4.657-685.2003>>.

AKINC, Akin; MAIER, Martin A.; MANOHARAN, Muthiah; *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature nanotechnology**, v. 14, n. 12, p. 1084–1087, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>>.

ALAMI-MILANI, Mitra; ZAKERI-MILANI, Parvin; VALIZADEH, Hadi; *et al.* Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL micelles as potential nanocarriers for ocular delivery of dexamethasone. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 21, n. 2, p. 153–164, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.22038/IJBMS.2017.26590.6513>>.

AMARAL, Patrícia; CHRISTIE, Rhona; GRESHAM, Daisy O. F.; *et al.* Underlying biology, challenges and emergent concepts in the treatment of relapsed and refractory pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 39, n. 11, p. 2575–2589, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41375-025-02723-2>>.

AMAR-LEWIS, Eliz; COHEN, Limor; CHINTAKUNTA, Ramesh; *et al.* Elucidating siRNA cellular delivery mechanism mediated by Quaternized starch nanoparticles. **Small**, v. 20, n. 51, p. e2405524, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/sml.202405524>>.

ARMANIOUS, Antonius; GERELLI, Yuri; MICCIULLA, Samantha; *et al.* Probing the separation distance between biological nanoparticles and cell membrane mimics using neutron reflectometry with sub-nanometer accuracy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 144, n. 45, p. 20726–20738, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jacs.2c08456>>.

AYDIN, Omer; KANARYA, Dilek; YILMAZ, Ummugulsum; *et al.* Determination of optimum ratio of cationic polymers and small interfering RNA with agarose gel retardation assay. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2434, p. 117–128, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_7>.

BABANYINAH, Godwin K.; BHADRAN, Abhi; POLARA, Himanshu; *et al.* Maleimide functionalized polycaprolactone micelles for glutathione quenching and doxorubicin delivery. **Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)**, v. 15, n. 26, p. 9987–10001, 2024. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/sc/d4sc01625d>>. Acesso em: 7 out. 2025.

BAG, Saientan; RAUWOLF, Stefan; SCHWAMINGER, Sebastian P.; *et al.* DNA binding to the silica: Cooperative adsorption in action. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 37, n. 19, p. 5902–5908, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00381>>.

BARDELLI, Valentina; ARNIANI, Silvia; PIERINI, Valentina; *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukemia: Biomarkers and their clinical usefulness. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1118, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/genes12081118>>.

BARRERAS-URBINA, Carlos Gregorio; RAMÍREZ-WONG, Benjamín; LÓPEZ-AHUMADA, Guadalupe Amanda; *et al.* Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. **International journal of food properties**, v. 19, n. 9, p. 1912–1923, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>>.

BEHL, Akanksha; SOLANKI, Subhash; PASWAN, Shravan K.; *et al.* Biodegradable PEG-PCL nanoparticles for co-delivery of MUC1 inhibitor and doxorubicin for the confinement of triple-negative breast cancer. **Journal of polymers and the environment**, v. 31, n. 3, p. 999–1018, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10924-022-02654-4>>.

BEHZADI, Shahed; SERPOOSHAN, Vahid; TAO, Wei; *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 14, p. 4218–4244, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c6cs00636a>>.

BISHOYI, Ashok Kumar; NOURI, Sina; HUSSEN, Ahmed; *et al.* Nanotechnology in leukemia therapy: revolutionizing targeted drug delivery and immune modulation. **Clinical and experimental medicine**, v. 25, n. 1, p. 166, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10238-025-01686-z>>.

BLONDER, J. M.; BAIRD, L.; FULFS, J. C.; *et al.* Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. **Life sciences**, v. 65, n. 21, p. PL261-6, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00495-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00495-6)>.

BONNEAU, Fabien; BASQUIN, Jérôme; STEIGENBERGER, Barbara; *et al.* Nuclear mRNPs are compact particles packaged with a network of proteins promoting RNA-RNA interactions. **Genes & development**, v. 37, n. 11–12, p. 505–517, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gad.350630.123>>.

BROWN, Joel S.; AMEND, Sarah R.; AUSTIN, Robert H.; *et al.* Updating the definition of cancer. **Molecular cancer research: MCR**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>>.

BUCKLEY, Maxim; YEUNG, David T.; WHITE, Deborah L.; *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukaemia: subtype prevalence, clinical outcome, and emerging targeted treatments. **Leukemia**, v. 39, n. 6, p. 1294–1310, 2025. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41375-025-02599-2>>. Acesso em: 7 nov. 2025.

BULCHA, Jote T.; WANG, Yi; MA, Hong; *et al.* Viral vector platforms within the gene therapy landscape. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 53, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00487-6>>. Acesso em: 25 set. 2025.

CAMILO, Fábio Marques; DOS SANTOS CANÊDO, Giovana; CARDOSO, A. L. asparaginase e perspectivas no tratamento da leucemia linfoblástica aguda: revisão de literatura. **Rev. Cient. Esc. Estadual Saúde Pública de Goiás Cândido Santiago**, p. 80009–80009, 2022. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1359838>>. Acesso em: 7 nov. 2025.

CARDARELLI, Francesco; DIGIACOMO, Luca; MARCHINI, Cristina; *et al.* The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25879, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep25879>>.

CARDOSO, Sara; SOUSA, Fani; PESSOA FILHO, Pedro A.; *et al.* Understanding the adsorption of plasmid DNA and RNA molecules onto arginine-agarose chromatographic resin. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 5, p. 3893–3901, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-022-07239-x>>.

CARO-LEÓN, Francisco J.; SILVA-CAMPA, Erika; NAVARRO-LÓPEZ, René A.; *et al.* Production and characterization of nanoparticulate polyelectrolyte complexes of chitosan-catechol, ulvan, and hyaluronic acid. **ACS Omega**, v. 10, n. 4, p. 3474–3485, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.4c07429>>.

CARRASCO, Manuel J.; ALISHETTY, Suman; ALAMEH, Mohamad-Gabriel; *et al.* Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. **Communications biology**, v. 4, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42003-021-02441-2>>.

CARVALHO, Patrícia M.; FELÍCIO, Mário R.; SANTOS, Nuno C.; *et al.* Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. **Frontiers in chemistry**, v. 6, n. 237, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>>.

CHEN, Yu; LIU, Sichu; SHEN, Qi; *et al.* Differential gene expression profiles of PPP2R5C-siRNA-treated malignant T cells. **DNA and cell biology**, v. 32, n. 10, p. 573–581, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/dna.2013.2138>>.

CHI, Zuofei; ZHANG, Bin; SUN, Ruowen; *et al.* USP44 accelerates the growth of T-cell acute lymphoblastic leukemia through interacting with WDR5 and repressing its ubiquitination. **International Journal of Medical Sciences**, v. 19, n. 14, p. 2022–2032, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7150/ijms.74535>>.

CHIARETTI, Sabina; ZINI, Gina; BASSAN, Renato. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology and**

Infectious Diseases, v. 6, n. 1, p. e2014073, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2014.073>>.

CHOI, Ki Young; CORREA, Santiago; MIN, Jouha; *et al.* Binary targeting of siRNA to hematologic cancer cells in vivo using layer-by-layer nanoparticles. **Advanced functional materials**, v. 29, n. 20, p. 1900018, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201900018>>.

CHONG, Zhi Xiong; YEAP, Swee Keong; HO, Wan Yong. Transfection types, methods and strategies: a technical review. **PeerJ**, v. 9, n. e11165, p. e11165, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11165>>.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 697, p. 63–70, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6>.

COOPER, Geoffrey. **The cell: A molecular approach**. 2. ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, 2000.

CORNEBISE, Mark; NARAYANAN, Elisabeth; XIA, Yan; *et al.* Discovery of a novel amino lipid that improves lipid nanoparticle performance through specific interactions with mRNA. **Advanced functional materials**, v. 32, n. 8, p. 2106727, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/adfm.202106727>>.

COX, Alysia; LIM, Siyoung A.; CHUNG, Eun Ji. Strategies to deliver RNA by nanoparticles for therapeutic potential. **Molecular aspects of medicine**, v. 83, n. 100991, p. 100991, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2021.100991>>.

DE CROZALS, Gabriel; BONNET, Romaric; FARRE, Carole; *et al.* Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. **Nano today**, v. 11, n. 4, p. 435–463, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2016.07.002>>.

DE LAURETIS, Angela; ERIKSSON AGGER, Anne; PAL, Antara; *et al.* Balancing sterilization and functional properties in Pluronic 407 hydrogels: comparing heat

and radiation techniques. **Regenerative Biomaterials**, v. 12, p. rbaf005, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/rb/rbaf005>>.

DHIMAN, Ashish; SHAH, Yagni; RANA, Dhvani; *et al.* Comprehensive review on glioblastoma: nanotechnology, immunotherapy and combined therapeutic approaches. **RSC pharmaceuticals**, v. 2, n. 2, p. 207–234, 2025. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2025/pm/d4pm00263f>>. Acesso em: 26 set. 2025.

DI SILVIO, Desirè; MARTÍNEZ-MORO, Marta; SALVADOR, Cristian; *et al.* Self-assembly of poly(allylamine)/siRNA nanoparticles, their intracellular fate and siRNA delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 557, p. 757–766, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2019.09.082>>.

DOURTHE, Marie Emilie; BARUCHEL, André. CAR T-cells for T-cell acute lymphoblastic leukemia. **EJC paediatric oncology**, v. 3, n. 100150, p. 100150, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcped.2024.100150>>.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & development**, v. 15, n. 2, p. 188–200, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gad.862301>>.

FANA, Michael; GALLIEN, John; SRINAGESHWAR, Bhairavi; *et al.* PAMAM dendrimer nanomolecules utilized as drug delivery systems for potential treatment of glioblastoma: A systematic review. **International journal of nanomedicine**, v. 15, p. 2789–2808, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S243155>>.

FENG, Panpan; CHEN, Dawei; WANG, Xia; *et al.* Inhibition of the m6A reader IGF2BP2 as a strategy against T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 36, n. 9, p. 2180–2188, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41375-022-01651-9>>. Acesso em: 25 nov. 2025.

FERRANDO, Adolfo A. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p. 353–361, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.353>>.

GARBAYO, Elisa; EL MOUKHTARI, Souhaila H.; RODRÍGUEZ-NOGALES, Carlos; *et al.* RNA-loaded nanoparticles for the treatment of hematological cancers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 214, n. 115448, p. 115448, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2024.115448>>.

GEORGE, Binsah; CHAN, Kok Hoe; RIOS, Adan. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: diagnostic pitfalls, genomic alteration, novel therapeutics, and minimal residual disease monitoring. **Frontiers in Hematology**, v. 3, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/frhem.2024.1463410>>.

GHERNAOUT, Djamel. Controlling coagulation process: From zeta potential to streaming potential. **American journal of environmental protection**, v. 4, n. 5, p. 16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11648/j.ajeps.s.2015040501.12>>.

GILBERT, Jennifer; ERMILOVA, Inna; FORNASIER, Marco; *et al.* On the interactions between RNA and titrateable lipid layers: implications for RNA delivery with lipid nanoparticles. **Nanoscale**, v. 16, n. 2, p. 777–794, 2024. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/nr/d3nr03308b>>. Acesso em: 8 jan. 2026.

GINN, Samantha L.; AMAYA, Anais K.; ALEXANDER, Ian E.; *et al.* Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. **The journal of gene medicine**, v. 20, n. 5, p. e3015, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jgm.3015>>.

GÖKBUGET, Nicola; BOISSEL, Nicolas; CHIARETTI, Sabina; *et al.* Management of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. **Blood**, v. 143, n. 19, p. 1903–1930, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.2023023568>>.

GORHOVS, Marks; DEKHTYAR, Yuri. Surface functionalization of nanoparticles for enhanced electrostatic adsorption of biomolecules. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 30, n. 15, p. 3206, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/molecules30153206>>.

GROSSEN, Philip; WITZIGMANN, Dominik; SIEBER, Sandro; *et al.* PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its

application. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 260, p. 46–60, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>>.

HAMIMED, Selma; JABBERI, Marwa; CHATTI, Abdelwaheb. Nanotechnology in drug and gene delivery. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 395, n. 7, p. 769–787, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-022-02245-z>>.

HASHIMOTO, Tomoko; KAWAZU, Takeshi; NAGASAKI, Takeshi; *et al.* Quantitative comparison between poly(L-arginine) and poly(L-lysine) at each step of polyplex-based gene transfection using a microinjection technique. **Science and technology of advanced materials**, v. 13, n. 1, p. 015009, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1088/1468-6996/13/1/015009>>.

HEIDARI, Razieh; KHOSRAVIAN, Pegah; MIRZAEI, Seyed Abbas; *et al.* siRNA delivery using intelligent chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles for overcoming multidrug resistance in malignant carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20531, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-00085-0>>. Acesso em: 26 jan. 2026.

HERNÁNDEZ-GIOTTONINI, Karol Yesenia; RODRÍGUEZ-CÓRDOVA, Rosalva Josefina; GUTIÉRREZ-VALENZUELA, Cindy Alejandra; *et al.* PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. **RSC Advances**, v. 10, n. 8, p. 4218–4231, 2020. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/ra/c9ra10857b>>. Acesso em: 20 jan. 2026.

HONG, Jinho; HONG, Chang Kook; SHIM, Sang Eun. Synthesis of polystyrene microspheres by dispersion polymerization using poly(vinyl alcohol) as a steric stabilizer in aqueous alcohol media. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, v. 302, n. 1–3, p. 225–233, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.02.027>>.

HORMANN, Femke M.; RUDD, Sean G. Nelarabine in T-cell acute lymphoblastic leukemia: intracellular metabolism and molecular mode-of-action. **Leukemia**, v. 39,

n. 3, p. 531–542, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41375-025-02529-2>>.

HOU, Zemin; ZHOU, Wencheng; GUO, Xi; *et al.* Poly(ϵ -caprolactone)-methoxypolyethylene glycol (PCL-MPEG)-based micelles for drug-delivery: The effect of PCL chain length on blood components, phagocytosis, and biodistribution. **International journal of nanomedicine**, v. 17, p. 1613–1632, 2022. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/poly-caprolactone-methoxypolyethylene-glycol-pcl-mpeg-based-micelles-f-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>>. Acesso em: 24 set. 2025.

HU, Bo; ZHONG, Liping; WENG, Yuhua; *et al.* Therapeutic siRNA: state of the art. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 101, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>>.

HUANG, Junjie; CHAN, Sze Chai; NGAI, Chun Ho; *et al.* Disease burden, risk factors, and trends of leukaemia: A global analysis. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 904292, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.904292>>.

HUANG, Rixiang; CARNEY, Randy P.; STELLACCI, Francesco; *et al.* Protein-nanoparticle interactions: the effects of surface compositional and structural heterogeneity are scale dependent. **Nanoscale**, v. 5, n. 15, p. 6928–6935, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c3nr02117c>>.

HUANG, Xin; SHEN, Qi; CHEN, Si; *et al.* Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 4, n. 1, p. 23, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-4-23>>.

HUSSAIN, Md Saddam; FAISAL, Khandokar Sadique; CLULOW, Andrew J.; *et al.* Influence of lyophilization and cryoprotection on the stability and morphology of drug-loaded poly(ethylene glycol-b- ϵ -caprolactone) micelles. **Polymers**, v. 15, n. 8, p. 1974, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/polym15081974>>.

ISLAM, Md Akhtarul; CHOWDHURY, Myisha Ahmed; MOZUMDER, Md Salatul Islam; *et al.* Langmuir adsorption kinetics in liquid media: Interface reaction

model. **ACS Omega**, v. 6, n. 22, p. 14481–14492, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c01449>>.

JACKSON, Meredith A.; WERFEL, Thomas A.; CURVINO, Elizabeth J.; *et al.* Zwitterionic nanocarrier surface chemistry improves siRNA tumor delivery and silencing activity relative to polyethylene glycol. **ACS Nano**, v. 11, n. 6, p. 5680–5696, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.7b01110>>.

JIANG, Tong; GONZALEZ, Karina Marie; CORDOVA, Leyla Estrella; *et al.* Nanotechnology-enabled gene delivery for cancer and other genetic diseases. **Expert opinion on drug delivery**, v. 20, n. 4, p. 523–540, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2023.2200246>>.

JIANG, Xingya; ABEDI, Kimia; SHI, Jinjun. Polymeric nanoparticles for RNA delivery. *In: Encyclopedia of Nanomaterials*. [s.l.]: Elsevier, 2023, p. 555–573.

JYOTSANA, N.; SHARMA, A.; CHATURVEDI, A.; *et al.* RNA interference efficiently targets human leukemia driven by a fusion oncogene in vivo. **Leukemia**, v. 32, n. 1, p. 224–226, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.269>>.

KACZMAREK, James C.; KAUFFMAN, Kevin J.; FENTON, Owen S.; *et al.* Optimization of a degradable polymer-lipid nanoparticle for potent systemic delivery of mRNA to the lung endothelium and immune cells. **Nano letters**, v. 18, n. 10, p. 6449–6454, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02917>>.

KANTARJIAN, Hagop; JABBOUR, Elias. Adult acute lymphoblastic leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American journal of hematology**, v. 100, n. 7, p. 1205–1231, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ajh.27708>>.

KAPSE, Anuja; ANUP, Neelima; PATEL, Vruti; *et al.* Polymeric micelles: a ray of hope among new drug delivery systems. *In: Drug Delivery Systems*. [s.l.]: Elsevier, 2020, p. 235–289.

KIM, Ahram; NG, Wei Beng; BERNT, William; *et al.* Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2639, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-38915-x>>. Acesso em: 19 jan. 2026.

KOOPAL, Luuk K.; AVENA, Marcelo J. A simple model for adsorption kinetics at charged solid–liquid interfaces. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 192, n. 1–3, p. 93–107, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7757\(01\)00719-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7757(01)00719-1)>.

LAISNEY, Jérôme; GURUSAMY, Dhandapani; BADDAR, Zeinah Elhaj; *et al.* RNAi in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells via nanomaterial mediated delivery of dsRNA: A comparison of poly-l-arginine polyplexes and poly-l-arginine-functionalized Au nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 23, p. 25645–25657, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c06234>>.

LANDRY, Breanne; VALENCIA-SERNA, Juliana; GUL-ULUDAG, Hilal; *et al.* Progress in RNAi-mediated molecular therapy of acute and chronic myeloid leukemia. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 4, n. e240, p. e240, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2015.13>>.

LE RU, Eric C.; BÖTTGER, Roland; ANDREWS, Darren; *et al.* Rapid and accurate quantification of RNA in lipid nanoparticles by scatter-free UV/visible spectroscopy. **Nano letters**, v. 25, n. 16, p. 6813–6819, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.5c01491>>.

LEE, Aaron; GOSNELL, Natalia; MILINKOVIC, Daela; *et al.* Layer-by-layer siRNA particle assemblies for localized delivery of siRNA to epithelial cells through surface-mediated particle uptake. **ACS applied bio materials**, v. 6, n. 1, p. 83–92, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsabm.2c00668>>.

LI, Tianshu; TAKEOKA, Shinji. A novel application of maleimide for advanced drug delivery: in vitro and in vivo evaluation of maleimide-modified pH-sensitive liposomes. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 3855–3866, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S47749>>.

LI, Yi; NOWAK, Chance M.; PHAM, Uyen; *et al.* Cell morphology-based machine learning models for human cell state classification. **Npj Systems Biology and Applications**, v. 7, n. 1, p. 23, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41540-021-00180-y>>. Acesso em: 2 fev. 2026.

LI, Yi; NOWAK, Chance M.; PHAM, Uyen; *et al.* Cell morphology-based machine learning models for human cell state classification. **Npj Systems Biology and Applications**, v. 7, n. 1, p. 23, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41540-021-00180-y>>. Acesso em: 2 fev. 2026.

LIANG, Hsin-Yu; LEE, Wei-Keung; HSU, Jui-Tsen; *et al.* Polycaprolactone in bone tissue engineering: A comprehensive review of innovations in scaffold fabrication and surface modifications. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 15, n. 9, p. 243, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/jfb15090243>>.

LIMA, I. L.; MESSIAS, S. H. N.; DIAS, A. T.; *et al.* Leucemia linfoblástica aguda: Fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 46, p. S368, 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137924009520>>.

LIU, Yu; EASTON, John; SHAO, Ying; *et al.* The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 49, n. 8, p. 1211–1218, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3909>>.

LUO, Jie; SCHMAUS, Johannes; CUI, Mochen; *et al.* Hyaluronate siRNA nanoparticles with positive charge display rapid attachment to tumor endothelium and penetration into tumors. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 329, p. 919–933, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.022>>.

MAESE, Luke; RAU, Rachel E. Current use of asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia/lymphoblastic lymphoma. **Frontiers in pediatrics**, v. 10, p. 902117, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fped.2022.902117>>.

MANSUR, Marcela Braga. **Mutações do gene NOTCH1 e outras alterações moleculares relacionadas à etiopatogênese das leucemias linfoblásticas agudas de**

linhagem T (LLA-T). 102 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

MARQUES, Cintia; MAURIZI, Lionel; BORCHARD, Gerrit; *et al.* Characterization challenges of self-assembled polymer-SPIONs nanoparticles: Benefits of orthogonal methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 16124, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms232416124>>.

MARTÍNEZ RIVAS, Claudia Janeth; TARHINI, Mohamad; BADRI, Waisudin; *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66–81, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>>.

MEN, Wanfu; ZHU, Peiyao; DONG, Siyuan; *et al.* Layer-by-layer pH-sensitive nanoparticles for drug delivery and controlled release with improved therapeutic efficacy in vivo. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 180–190, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2019.1709922>>.

MENDES, Bárbara B.; CONNIOT, João; AVITAL, Aviram; *et al.* Nanodelivery of nucleic acids. **Nature reviews. Methods primers**, v. 2, n. 1, p. 1–21, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s43586-022-00104-y>>. Acesso em: 25 set. 2025.

MÉNDEZ, Paula A.; LÓPEZ, Betty L. Polyelectrolyte nanoparticles of amphiphilic chitosan/pectin from banana peel as potential carrier system of hydrophobic molecules. **Polymers**, v. 12, n. 9, p. 2109, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/polym12092109>>.

MOCELLIN, Simone; PROVENZANO, Maurizio. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. **Journal of translational medicine**, v. 2, n. 1, p. 39, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-2-39>>.

MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI, Abdollah; FARBER, Irina M.; KHEIRI, Soleiman. Global incidence and mortality of childhood leukemia and its relationship with the Human Development Index. **PloS one**, v. 19, n. 7, p. e0304354, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0304354>>.

MOLLÉ, Lara M.; SMYTH, Cameron H.; YUEN, Daniel; *et al.* Nanoparticles for vaccine and gene therapy: Overcoming the barriers to nucleic acid delivery. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 14, n. 6, p. e1809, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1809>>.

MOVAFEGH, Bahareh; JALAL, Razieh; MOHAMMADI, Zobeideh; *et al.* Poly-L-arginine: Enhancing cytotoxicity and cellular uptake of doxorubicin and necrotic cell death. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 1448–1456, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1871520618666180412114750>>.

NOGUEIRA, Sara S.; SAMARIDOU, Eleni; SIMON, Johanna; *et al.* Analytical techniques for the characterization of nanoparticles for mRNA delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 198, n. 114235, p. 114235, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114235>>.

NUGRAHA, Dwianto Harry; ANGGADIREDA, Kusnandar; RACHMAWATI, Heni. Mini-review of poloxamer as a biocompatible polymer for advanced drug delivery. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902022e21125>>.

PARASHAR, Ashish Kumar; HARDENIA, Anu; DWIVEDI, Sunil Kumar; *et al.* Next-generation nucleic acid delivery: A review of nanobiosystem design and applications. **Current gene therapy**, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0115665232367377250519114910>>.

PASSOS GIBSON, Victor; TAHIRI, Houda; YANG, Chun; *et al.* Hyaluronan decorated layer-by-layer assembled lipid nanoparticles for miR-181a delivery in glioblastoma treatment. **Biomaterials**, v. 302, n. 122341, p. 122341, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122341>>.

PATEL, Pratikkumar; IBRAHIM, Nurudeen Mohammed; CHENG, Kun. The importance of apparent pKa in the development of nanoparticles encapsulating siRNA and mRNA. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 6, p. 448–460, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>>.

PAVLOVIC, Marko; LI, Li; DITS, Francois; *et al.* Aggregation of layered double hydroxide nanoparticles in the presence of heparin: towards highly stable delivery systems. **RSC Advances**, v. 6, n. 20, p. 16159–16167, 2016. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra26072h>>. Acesso em: 22 jan. 2026.

PECOT, Chad V.; CALIN, George A.; COLEMAN, Robert L.; *et al.* RNA interference in the clinic: challenges and future directions. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 59–67, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2966>>.

PERAZZIO, Aline D. O. S. S. Borgo. O que há de novo na leucemia linfoblástica aguda. 2022. Disponível em: <<https://www.fleury.com.br/medico/artigos-cientificos/o-que-ha-de-novo-na-leucemia-linfoblastica-aguda>>.

PÖLÖNEN, Petri; DI GIACOMO, Danika; SEFFERNICK, Anna Eames; *et al.* The genomic basis of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 632, n. 8027, p. 1082–1091, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-024-07807-0>>.

PUGSLEY, Charlotte E.; ISAAC, R. Elwyn; WARREN, Nicholas J.; *et al.* Protection of double-stranded RNA via complexation with double hydrophilic block copolymers: Influence of neutral block length in biologically relevant environments. **Biomacromolecules**, v. 23, n. 6, p. 2362–2373, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00136>>.

QIAN, Suying; ZHENG, Cuiping; WU, Yanfang; *et al.* Targeted therapy for leukemia based on nanomaterials. **Heliyon**, v. 10, n. 15, p. e34951, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34951>>.

RABEEA BANOON, Shaima; MAHDI, Duaa Saleh; GASAEM, Narjas Ali; *et al.* The role of nanoparticles in gene therapy: A review. **Journal of nanostructures**, v. 14, n. 1, p. 48–64, 2024. Disponível em: <https://jns.kashanu.ac.ir/article_114449.html>. Acesso em: 25 set. 2025.

RAHMAN, Md Ataur; JALOULI, Maroua; BHAJAN, Sujay Kumar; *et al.* A comprehensive review of nanoparticle-based drug delivery for modulating

PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 26, n. 5, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms26051868>>.

RAMOS, Rodrigo Henrique; CARELS, Nicolas; SCARDINI, Rafaela; *et al.* Identifying potential therapeutic targets for T-cell acute lymphoblastic leukemia using malignant networks and topological analysis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2025.10.08.681235>>.

RAMPOTAS, Alexandros; RODDIE, Claire. The present and future of CAR T-cell therapy for adult B-cell ALL. **Blood**, v. 145, n. 14, p. 1485–1497, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.2023022922>>.

RIBEIRO, Lígia Nunes de Moraes; COUTO, Verônica Muniz; FRACETO, Leonardo Fernandes; *et al.* Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 982, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-18573-7>>. Acesso em: 27 jan. 2026.

RILEY, Michael K.; VERMERRIS, Wilfred. Recent advances in nanomaterials for gene delivery-A review. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 5, p. 94, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/nano7050094>>.

RIOPEDRE-FERNANDEZ, Miguel; BIRIUKOV, Denys; DRAČÍNSKÝ, Martin; *et al.* Hyaluronan-arginine enhanced and dynamic interaction emerges from distinctive molecular signature due to electrostatics and side-chain specificity. **Carbohydrate Polymers**, v. 325, n. 121568, p. 121568, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121568>>.

ROWLAND, Seth; AGHAKHANI, Amirreza; WHALLEY, Richard D.; *et al.* Layer-by-layer nanoparticle assembly for biomedicine: Mechanisms, technologies, and advancement via acoustofluidics. **ACS Applied Nano Materials**, v. 7, n. 14, p. 15874–15902, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acsanm.4c02463>>.

SAKHI, Mirina; KHAN, Abad; KHAN, Ismail; *et al.* Effect of polymeric stabilizers on the size and stability of PLGA paclitaxel nanoparticles. **Saudi pharmaceutical**

journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society, v. 31, n. 9, p. 101697, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101697>>.

SALAMA, Maha M.; ABOREHAB, Nora M.; EL MAHDY, Nihal M.; *et al.* Nanotechnology in leukemia: diagnosis, efficient-targeted drug delivery, and clinical trials. **European journal of medical research**, v. 28, n. 1, p. 566, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40001-023-01539-z>>.

SANITÀ, Gennaro; CARRESE, Barbara; LAMBERTI, Annalisa. Nanoparticle surface functionalization: How to improve biocompatibility and cellular internalization. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 587012, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>>.

SANTOS, Aline Martins dos; MENEGUIN, Andréia Bagliotti; FONSECA-SANTOS, Bruno; *et al.* The role of stabilizers and mechanical processes on physico-chemical and anti-inflammatory properties of methotrexate nanosuspensions. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 57, n. 101638, p. 101638, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101638>>.

SANTOS, Guilherme dos Santos. Novas Estratégias em Imunoterapia com Células CAR-T em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Investigando a Ascensão da Terapêutica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 71, n. 3, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2025v71n3.5017>>.

SELVAMANI, Vijayakumar. Stability studies on nanomaterials used in drugs. *In: Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. [s.l.]: Elsevier, 2019, p. 425–444.

SHAABANI, Elnaz; SHARIFIAGHDAM, Maryam; DE KEERSMAECKER, Herlinde; *et al.* Layer by layer assembled chitosan-coated gold nanoparticles for enhanced siRNA delivery and silencing. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 831, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020831>>.

SHAO, Xiaojian; ZHANG, Hailei; ZHU, Zhou; *et al.* DpCoA tagSeq: Barcoding dpCoA-capped RNA for direct nanopore sequencing via maleimide-thiol reaction. **Analytical chemistry**, v. 95, n. 29, p. 11124–11131, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02063>>.

SHARMA, Aveksha; MISTRIEL-ZERBIB, Shani; NAJAR, Rauf Ahmad; *et al.* Isoforms of the TAL1 transcription factor have different roles in hematopoiesis and cell growth. **PLoS Biology**, v. 21, n. 6, p. e3002175, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3002175>>.

SILVA, Dálete de Souza Coelho; SILVA, Iris Edná Pereira da; ALMEIDA, Faraildes Maria Cavalcanti; *et al.* PERFIL INFANTO-JUVENIL E SOBREVIDA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO / INFANTO-YOUTH PROFILE AND SURVIVAL OF PATIENTS WITH ACUTE LYMPHID LEUKEMIA OF BRAZILIAN SEMI-ARID. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 25085–25093, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n3-286>>.

SIN, Chun-Fung; MAN, Pui-Hei Marcus. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Diagnosis, updates in molecular pathogenesis, management, and novel therapies. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 750789, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.750789>>.

SINANI, Genada; DURGUN, Meltem Ezgi; CEVHER, Erdal; *et al.* Polymeric-Micelle-based delivery systems for nucleic acids. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2021, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15082021>>.

SINHA, Surekharani; TRIPATHI, Arpan Kumar; PANDEY, Ashish; *et al.* Self-assembled PEGylated micelles for precise and targeted drug delivery: Current challenges and future directions. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 60, n. 103296, p. 103296, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103296>>.

SOMOSI, Zoltán; PAVLOVIC, Marko; PÁLINKÓ, István; *et al.* Effect of polyelectrolyte mono- and bilayer formation on the colloidal stability of layered

double hydroxide nanoparticles. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 12, p. 986, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/nano8120986>>.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>>.

SUN, Xiangyang; DAI, Haixue; GUO, Ping; *et al.* Biocompatibility of a new kind of polyvinyl alcohol embolic microspheres: In vitro and in vivo evaluation. **Molecular biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 610–621, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00166-6>>.

SWENSON, Hans; STADIE, Nicholas P. Langmuir's theory of adsorption: A centennial review. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 35, n. 16, p. 5409–5426, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00154>>.

SWITALSKI, Kacper; FAN, Jingyu; LI, Luxi; *et al.* Direct measurement of Stokes-Einstein diffusion of Cowpea mosaic virus with 19 μ s-resolved XPCS. **Journal of synchrotron radiation**, v. 29, n. Pt 6, p. 1429–1435, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1107/S1600577522008402>>.

SZERLAUTH, Adél; MURÁTH, Szabolcs; SZILAGYI, Istvan. Layered double hydroxide-based antioxidant dispersions with high colloidal and functional stability. **Soft Matter**, v. 16, n. 46, p. 10518–10527, 2020. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/sm/d0sm01531h>>. Acesso em: 22 jan. 2026.

TEBBI, Cameron K. Etiology of acute leukemia: A review. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2256, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/cancers13092256>>.

VAN VLIERBERGHE, Pieter; FERRANDO, Adolfo. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3398–3406, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/JCI61269>>.

VARELA-MOREIRA, Aida; SHI, Yang; FENS, Marcel H. A. M.; *et al.* Clinical application of polymeric micelles for the treatment of cancer. **Materials chemistry frontiers**, v. 1, n. 8, p. 1485–1501, 2017. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/qm/c6qm00289g>>. Acesso em: 27 nov. 2025.

VÁSÁRHELYI, Livia; HEGEDŰS, Tímea; SÁRINGER, Szilárd; *et al.* Stability of boron nitride nanosphere dispersions in the presence of polyelectrolytes. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 37, n. 17, p. 5399–5407, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00656>>.

VOGEL, Robert; PAL, Anoop K.; JAMBHRUNKAR, Siddharth; *et al.* High-resolution single particle zeta potential characterisation of biological nanoparticles using tunable resistive pulse sensing. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17479, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-14981-x>>. Acesso em: 9 set. 2025.

WANG, Maoze; LIU, Huina; HUANG, Jinling; *et al.* Advancing cancer gene therapy: the emerging role of nanoparticle delivery systems. **Journal of nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, p. 362, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12951-025-03433-8>>.

WANG, Yue; LIU, Jun; CUI, Hongyan; *et al.* Triple-transformable dynamic surroundings for programmed transportation of bio-vulnerable mRNA payloads towards systemic treatment of intractable solid tumors. **Biomaterials**, v. 311, n. 122677, p. 122677, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122677>>.

WATCHARADULYARAT, Natsorn; RATTANATAYAROM, Monthira; RUANGSAWASDI, Nisarath; *et al.* PEG-PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 266, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-023-27500-y>>. Acesso em: 19 jan. 2026.

WILLIFORD, John-Michael; WU, Juan; REN, Yong; *et al.* Recent advances in nanoparticle-mediated siRNA delivery. **Annual review of biomedical engineering**,

v. 16, n. 1, p. 347–370, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105119>>.

XIAO, Bowen; WANG, Shaopeng; PAN, Yu; *et al.* Development, opportunities, and challenges of siRNA nucleic acid drugs. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 36, n. 1, p. 102437, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102437>>.

XU, Cong-Fei; WANG, Jun. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.011>>.

XU, Jia; WANG, Jing; WAN, Yucai; *et al.* High-yield of nucleic acid adsorption via poly(vinyl alcohol-co-ethylene) nanofiber-based anion-exchange chitosan aerogel membrane with controllable porosity. **Advanced materials interfaces**, v. 9, n. 20, p. 2200613, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/admi.202200613>>.

YU, Cheng; LI, Long; HU, Pei; *et al.* Recent advances in stimulus-responsive nanocarriers for gene therapy. **Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 8, n. 14, p. 2100540, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/advs.202100540>>.

ZELEZNIK-LE, Nancy J. Leukemia RNAi: harnessing the killer within. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3336–3337, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-08-3500>>.

ZHANG, Heyang; BARZ, Matthias. Investigating the stability of RNA-lipid nanoparticles in biological fluids: Unveiling its crucial role for understanding LNP performance. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 381, n. 113559, p. 113559, 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.02.055>>.

ZHANG, Junfang. Physical insights into kinetic models of adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 229, n. 115832, p. 115832, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115832>>.

ZHANG, Xinyi; LIANG, Tianying; MA, Qingming. Layer-by-Layer assembled nano-drug delivery systems for cancer treatment. **Drug delivery**, v. 28, n. 1, p. 655–669, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2021.1905748>>.

ZHENG, Yuting; OZ, Yavuz; GU, Yimin; *et al.* Rational design of polymeric micelles for targeted therapeutic delivery. **Nano today**, v. 55, n. 102147, p. 102147, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2024.102147>>.

ZHONG, Wenbin; YI, Qing; XU, Bing; *et al.* ORP4L is essential for T-cell acute lymphoblastic leukemia cell survival. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 12702, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms12702>>. Acesso em: 25 nov. 2025.

ZHOU, Xin Xin; JIN, Long; QI, Rui Qun; *et al.* pH-responsive polymeric micelles self-assembled from amphiphilic copolymer modified with lipid used as doxorubicin delivery carriers. **Royal Society open science**, v. 5, n. 3, p. 171654, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rsos.171654>>.

ZHU, Huiqing; XU, Suyue; SHANG, Guoshuo; *et al.* Fabrication of hyaluronic acid-based nanoparticles and studies on their radical scavenging activity. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 35, n. 3, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/pat.6332>>.

ZHU, Xi; TAO, Wei; LIU, Danny; *et al.* Surface DE-PEGylation controls nanoparticle-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. **Theranostics**, v. 7, n. 7, p. 1990–2002, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7150/thno.18136>>.

Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 29 maio 2025.