

Lucas Miguel Pereira de Souza

**Transposição de siRNA encapsulado com
polímeros através de modelos de surfactante
pulmonar na interface**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Química, do Departamento de Química da PUC-Rio

Orientador: André Silva Pimentel

Rio de Janeiro
Agosto de 2024



Lucas Miguel Pereira de Souza

**Transposição de siRNA encapsulado com
polímeros através de modelos de surfactante
pulmonar na interface**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio. Avaliada pela Comissão Examinadora Abaixo:

Prof. André Silva Pimentel

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Frederico Wanderley Tavares

UFRJ

Prof. Laurent Emmanuel Dardenne

LNCC

Prof. Pedro Geraldo Pascutti

UFRJ

Prof. Welles Antônio Martinez Morgado

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Felipe Rodrigues de Souza

IFMG

Rio de Janeiro

28 de agosto de 2024

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial do trabalho é proibida sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Lucas Miguel Pereira de Souza

Graduado em Química pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Atua na área de simulação molecular com aplicação em fármacos e modelos de surfactante pulmonar.

Ficha Catalográfica

Souza, Lucas Miguel Pereira de

Transposição de siRNA encapsulado com polímeros através de modelos de surfactante pulmonar na interface / Lucas Miguel Pereira de Souza ; orientador: André Silva Pimentel. – 2024.

102 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2024.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Surfactante pulmonar. 3. siRNA. 4. TNF- α . 5. Inflamação. 6. Dinâmica molecular. I. Pimentel, André Silva. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

À minha mãe, minha rainha
por todo apoio e dedicação

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por esta e por todas as conquistas que me proporcionou.

Agradeço a minha mãe, minha rainha, minha guerreira, por ter apostado todas as fichas em mim. Eu não teria chegado até aqui se não fosse por ela.

Agradeço ao meu orientador André Pimentel por tudo. Por todos os ensinamentos, por todas as oportunidades, por toda ajuda, por estar presente e apoiar diretamente cada grande conquista.

Agradeço a todos os meus professores por me inspirar a perseguir uma carreira tão maravilhosa e cheia de desafios. Por todo apoio, confiança e carinho.

Agradeço a cada amigo que esteve comigo e me apoiou diretamente nos momentos mais difíceis. Agradeço aos amigos que mesmo estando longe, estão perto. Aos amigos que sempre procuram manter contato.

Agradeço ao dimesilato de lisdexanfetamina por ser imprescindível para a escrita deste documento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

de Souza, Lucas Miguel Pereira; Pimentel, André Silva. **Transposição de siRNA encapsulado com polímeros através de modelos de surfactante pulmonar na interface**. Rio de Janeiro, 2024. 102 p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Simulações de dinâmica molecular *coarse-grained* foram usadas para investigar diferentes polímeros para o encapsulamento de um siRNA para a transposição em modelos de surfactante pulmonar. Os modelos consistiam em uma monocamada de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) ou uma mistura 70:30 de DPPC e 1,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (DPPG). Os nanocarreadores escolhidos para encapsular o siRNA anti-TNF foram o polietilenoglicol (PEG) e a polietilenimina (PEI). Acredita-se que o uso do siRNA para o silenciamento genético da citocina TNF pode ser terapêutico para algumas doenças inflamatórias, em especial, pulmonares. As simulações mostraram que as nanopartículas contendo apenas PEG promovem o arraste de fosfolipídeos do modelo de surfactante pulmonar, formando uma coroa lipídica. As nanopartículas contendo apenas PEI ou PEI e PEG causaram certas perturbações à monocamada, porém, nenhum colapso do filme durante a transposição da nanopartícula foi observado. O método de amostragem guarda-chuva foi utilizado para calcular a energia livre de Gibbs da transposição da nanopartícula através do modelo de surfactante pulmonar contendo apenas DPPC. A presença do PEG na nanopartícula causou uma diminuição na energia livre de Gibbs em relação ao siRNA não-encapsulado, enquanto a presença do PEI não causou mudança. Os resultados implicam que siRNA encapsulado com ambos PEI e PEG melhoram a transposição do siRNA anti-TNF através de modelos de surfactante pulmonar na interface gás-líquido.

Palavras-chave

siRNA; TNF; dinâmica molecular; surfactante pulmonar.

Abstract

de Souza, Lucas Miguel Pereira; Pimentel, André Silva (Advisor). **Transposition of polymer-encapsulated siRNA through lung surfactant models at the interface**. Rio de Janeiro, 2024. 102 p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Coarse-grained molecular dynamics was used to investigate different polymers to encapsulate the siRNA for its transposition through two lung surfactant models. These models consisted of a monolayer containing either 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) or a 70:30 mixture of DPPC and 1,2-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol) (DPPG). The nanocarriers chosen to encapsulate the anti-TNF siRNA were polyethylene glycol (PEG) and polyethyleneimine (PEI). It is believed that the use of siRNA to genetically silence the cytokine TNF might be therapeutic to treat several inflammatory diseases, in particular, pulmonary ones. The simulations showed that the nanoparticles containing PEG promoted the lipid depletion of the lung surfactant model by forming a lipid corona. The nanoparticles containing only PEI, or both PEG and PEI showed some perturbation of the lung surfactant model, however no collapse during the nanoparticle transposition was observed. The umbrella sampling method was used to calculate the Gibbs free energy of transposition through the pure DPPC lung surfactant model. The nanoparticles containing PEG showed a decreased Gibbs free energy as compared with naked siRNA, while PEI nanoparticles have not caused any change. The implication of this finding is that siRNA encapsulated with both PEI and PEG enhances the transposition of anti-TNF siRNA through lung surfactant models at the gas-liquid interface.

Keywords

siRNA; TNF; molecular dynamics; lung surfactant.

Sumário

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introdução | 17 |
| 1.1. | O surfactante pulmonar | 19 |
| 1.2. | Citocinas e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) | 21 |
| 1.3. | Silenciamento genético: o siRNA | 23 |
| 1.4. | Carreadores | 24 |
| 2. | Objetivos | 29 |
| 2.1. | Objetivos específicos | 29 |
| 3. | Fundamentação Teórica | 30 |
| 3.1. | Dinâmica Molecular e campos de força | 30 |
| 3.2. | O campo de força <i>coarse-grained</i> | 34 |
| 3.3. | Algoritmos | 37 |
| 3.3.1. | Ensembles e condições periódicas de contorno | 37 |
| 3.3.2. | Minimização de energia | 40 |
| 3.3.3. | Acoplamento de temperatura | 41 |
| 3.3.4. | Acoplamento de pressão | 43 |
| 3.3.5. | Algoritmo de restrição (LINCS) | 45 |
| 3.3.6. | Métodos de integração | 46 |
| 3.4. | Cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG) | 47 |
| 3.4.1. | Amostragem guarda-chuva | 48 |
| 4. | Metodologia | 51 |
| 4.1. | Modelos CG | 51 |
| 4.2. | Preparação da nanopartícula | 52 |
| 4.3. | Preparação do modelo de surfactante pulmonar | 54 |
| 4.4. | Detalhes das simulações | 55 |
| 4.5. | Cálculos do ΔG | 57 |
| 4.6. | Outras análises | 58 |
| 5. | Resultados e Discussões | 60 |
| 5.1. | Resultados Preliminares | 60 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. Transposição de nanopartículas em DPPC | 64 |
| 5.3. Transposição de nanopartículas em DPPC/DPPG | 66 |
| 5.4. Extensão de simulações | 66 |
| 5.5. Parâmetros de ordem | 70 |
| 5.6. Função de distribuição radial | 71 |
| 5.7. Resultados dos cálculos de ΔG | 72 |
| 5.8. Implicações e Perspectivas | 74 |
| | |
| 6. Conclusão | 76 |
| | |
| 7. Referências Bibliográficas | 77 |
| | |
| ANEXOS | |
| Anexo A Estrutura do fator de necrose tumoral (TNF) | 98 |
| Anexo B Artigo publicado | 99 |
| Anexo C Trabalho premiado apresentado em seminário internacional | 100 |
| Anexo D Experimentos realizados em colaboração | 101 |

Lista de figuras e tabelas

- Fig. 01.** Estrutura de um alvéolo.
- Fig. 02.** Representação do surfactante pulmonar.
- Fig. 03.** Estruturas do DPPC e do DPPG.
- Fig. 04.** Mecanismo de ação do siRNA.
- Fig. 05.** Estruturas do PEI e do PEG.
- Fig. 06.** Interações ligadas.
- Fig. 07.** Tipos de grãos do campo de força MARTINI.
- Fig. 08.** Mapeamento e parametrização das moléculas de benzeno, DPPC, e colesterol no campo de força MARTINI.
- Fig. 09.** Periodicidade em um sistema contendo uma molécula de siRNA no campo de força MARTINI.
- Fig. 10.** Modelos de surfactante pulmonar no campo de força MARTINI.
- Fig. 11.** Coordenada de reação ξ da transposição do siRNA/nanopartículas da fase vácuo (**G₀**) para a fase aquosa (**G**).
- Fig. 12.** Modelos CG das moléculas presentes no sistema.
- Fig. 13.** Nanopartículas de siRNA e polímeros PEI e PEG.
- Fig. 14.** Configuração inicial das NPs no sistema de DPPC.
- Fig. 15.** Configuração inicial das NPs no sistema de DPPC/DPPG.
- Fig. 16.** Estrutura e nomenclatura do DPPC no campo de força MARTINI.
- Fig. 17.** Evolução da área XY da caixa ao longo do tempo de simulação nas etapas de equilíbrio.
- Fig. 18.** Configuração das nanopartículas após 200 ns em água.
- Fig. 19.** Simulações não-enviesadas e sem arraste de siRNA nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG, respectivamente.
- Fig. 20.** Simulações não-enviesadas de PEI + PEG nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG.
- Fig. 21.** Simulações não-enviesadas de siRNA/PEI/PEG nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG.
- Fig. 22.** Configurações dos sistemas de DPPC após 200 ns.
- Fig. 23.** A transposição da NP contendo PEI induz a formação de um agregado que é readsorvido à monocamada após 200 ns.
- Fig. 24.** Configurações dos sistemas de DPPC/DPPG após 200 ns.

- Fig. 25.** A transposição da NP contendo PEI induz a formação de um agregado que é readsorvido à monocamada após mais 200 ns de simulação.
- Fig. 26.** Extensão das simulações dos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC por mais 200 ns.
- Fig. 27.** Agregados de DPPC e PEG nos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC.
- Fig. 28.** Extensão das simulações dos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC/DPPG por mais 200 ns.
- Fig. 29.** Agregados de DPPC e PEG nos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC/DPPG.
- Fig. 30.** Parâmetros de ordem calculados para as ligações das cadeias hidrocarbônicas de DPPC.
- Fig. 31.** Curvas de função da distribuição radial ($g(r)$) de moléculas de DPPC ao redor do siRNA durante os últimos 50 ns de simulação.
- Fig. 32.** Perfis de potencial de força média (PMF) da transposição das NPs em um filme de DPPC.
- Fig. 33.** Comparação das curvas de PMF da transposição da NP siRNA/PEI/PEG nas monocamadas de DPPC e DPPC/DPPG.
- Fig. 34.** Ensaio de citotoxicidade de cigarros eletrônicos em células do tecido epitelial pulmonar.
- Fig. 35.** Ilustração da microscopia de força atômica utilizada para o cálculo das forças de adesão entre nanopartículas de siRNA e uma superfície recoberta por surfactante pulmonar.

Tabela 1. Valores de ΔG calculado pelos gráficos.

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| AA | <i>All-atom</i> |
| AMBER | <i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i> |
| AH | Ácido Hialurônico |
| AT1/AT2 | <i>Alveolar Type 1/2 – Células Alveolares Tipo 1/2</i> |
| BCG | Bacilo Calmette-Guérin |
| CG | <i>Coarse-grained</i> |
| CHARMM | <i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i> |
| COVID-19 | <i>Coronavirus disease 2019</i> |
| DOTAP | (N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil), N,N,N-trimetilamônio) |
| DPOC | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica |
| DPPC | 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina |
| DPPG | 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidil-(1'-sn-glicerol) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GROMACS | <i>GRoningen MACHine for Chemical Simulations</i> |
| GROMOS | <i>GRoningen MOlecular Simulation</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| DM | Dinâmica Molecular |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NP | Nanopartícula |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPLS | <i>Optimized Potential for Liquid Simulations</i> |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PEI | Polietilenimina |
| PI | Fosfatidilinositol |
| PG | Fosfatidilglicerol |
| PMG | <i>Potential of Mean Force / Potencial de Força Média</i> |
| RISC | <i>RNA Induced Silencing Complex – Complexo Silenciador Induzido por RNA</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico</i> |
| SAR-RN | Síndrome da Angústia Respiratória do Recém-Nascido |
| SARS | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> |

| | |
|--------------------|--|
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| SDRA | Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo |
| siRNA | <i>Small interfering RNA</i> / RNA pequeno interferente |
| SP | Surfactante Pulmonar |
| SP-A | <i>Surfactant Protein A</i> |
| SP-B | <i>Surfactant Protein B</i> |
| SP-C | <i>Surfactant Protein C</i> |
| SP-D | <i>Surfactant Protein D</i> |
| SRAG | Síndrome Respiratória Aguda Grave |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> – Fator de Necrose Tumoral |
| TNFR1/TNFR2 | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1/2</i> – Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1/2 |
| UA | <i>United-atom</i> |
| US | <i>Umbrella Sampling</i> |
| UTI | Unidade de Tratamento Intensivo |
| WHAM | <i>Weighted Histogram Analysis Method</i> |

Lista de Símbolos

| | |
|------------------|--|
| γ | Tensão Superficial |
| P_c | Pressão de Colapso |
| r_a | Raio Alveolar |
| r_i | Posição de um átomo i |
| m_i | Massa de um átomo i |
| F_i | Força atuando em um átomo i |
| N | Número de átomos/partículas do sistema |
| t | Tempo de simulação |
| V | Energia Potencial |
| V_L | Potencial de interações ligadas |
| V_{NL} | Potencial de interações não-ligadas |
| V_B | Potencial de ligação covalente |
| V_θ | Potencial de deformação angular |
| V_ϕ | Potencial de diedro próprio |
| V_ω | Potencial de diedro impróprio |
| r_{ij} | Distância entre os átomos i e j |
| k_{ij}^b | Constante de força da ligação entre os átomos i e j |
| b_{ij} | Distância de equilíbrio da ligação entre os átomos i e j |
| θ_{ijk} | Ângulo formado pelos átomos i, j e k |
| k_{ijk}^θ | Constante de força do ângulo formado pelos átomos i, j e k |
| θ_{ijk}^0 | Ângulo de equilíbrio entre os átomos i, j e k |
| ω_{ijkl} | Diedro impróprio entre os planos dos átomos i j k e i k l |
| k_{ijk}^ω | Constante de força do diedro impróprio |
| ω_{ijk}^0 | Diedro impróprio de equilíbrio |
| ϕ_{ijkl} | Diedro entre os planos dos átomos i j k e j k l |
| k_{ijkl}^ϕ | Constante de força do diedro |
| ϕ_{ijkl}^s | Constante de fase |
| $C_{ij}^{(12)}$ | Constante do termo repulsivo do potencial de Lennard-Jones |

| | |
|-----------------|--|
| $C_{ij}^{(6)}$ | Constante do termo atrativo do potencial de Lennard-Jones |
| q_i | Carga de um átomo i |
| f | Constante da lei de Coulomb |
| ε | Constante dielétrica |
| σ_{ij} | Distância máxima entre um par de partículas i e j não-ligadas. |
| ϵ_{ij} | Tamanho do poço do potencial de Lennard-Jones |
| $\log_{10} P$ | Coeficiente de partição |
| \tilde{N} | Tamanho de réplicas de um ensemble |
| NVT | Ensemble canônico |
| NPT | Ensemble Isotérmico-Isobárico |
| NVE | Ensemble microcanônico |
| μ VT | Ensemble grande canônico |
| V | Volume do sistema |
| T | Temperatura do sistema |
| P | Pressão do sistema |
| E | Energia do sistema |
| μ | Potencial químico do sistema |
| E_i | Energia de um microestado i |
| k_b | Constante de Boltzmann |
| V_{dir} | Potencial de interações de curto alcance |
| V_{rec} | Potencial de interações de longo alcance |
| β | Peso relativo entre os somatórios V_{dir} e V_{rec} |
| h_n | Constante de deslocamento da minimização de energia |
| v_i | Velocidade inicial do átomo i |
| $b(v_i)$ | Distribuição de Boltzmann |
| τ | Constante de acoplamento do termostato |
| E_k | Energia cinética |
| C_V | Capacidade térmica |
| N_{df} | Número de graus de liberdade |
| Ξ | Tensor do virial |
| λ | Fator de escalonamento de velocidades |

| | |
|------------------------|---|
| μ_P | Fator de escalonamento de posições e tamanho da caixa |
| τ_P | Constante de acoplamento do barostato |
| κ_T | Compressibilidade isotérmica do sistema |
| δ_{ij} | Função delta de Kronecker |
| $P_{xx}/P_{yy}/P_{zz}$ | Componentes da pressão nas respectivas direções |
| L_z | Tamanho da caixa no eixo z |
| $k(t)$ | Multiplicador de Lagrange do algoritmo LINCS |
| g_k | Função de restrição do algoritmo LINCS |
| d_i | Distância de restrição |
| ξ | Coordenada de reação |
| $P(\xi)/P_i^u(\xi)$ | Função de distribuição temporal |
| $w_i(\xi)$ | Potencial viés |
| $P_i^b(\xi)$ | Função de distribuição temporal enviesada |
| K_w | Constante de Força do viés harmônico |

1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), das 10 principais causas de morte, 3 são doenças respiratórias, que levam mais de 8 milhões a óbito anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Anualmente, 3,2 milhões de pessoas morrem devido a complicações causadas pela doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (LI et al., 2020); mais de 350 milhões são afetadas por asma (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2022); 2,4 milhões de pessoas morrem por pneumonia (LOZANO et al., 2012); 1,4 milhão morrem de tuberculose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023); e 1,8 milhão de pessoas são mortas pelo câncer de pulmão, um dos cânceres mais letais (SUNG et al., 2021). Os maiores fatores de risco dessas doenças incluem o tabagismo, a má qualidade do ar em grandes cidades e em espaços ocupacionais, e a falta de acesso à saúde e informação, especialmente em países em desenvolvimento (FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES, 2021). Além dessas fatalidades, mais de 7 milhões de pessoas vieram a óbito devido à pandemia de COVID-19, sendo mais de 700 mil brasileiros até abril de 2024 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024). Apesar de os números não serem novidade, nos últimos anos, a atual pandemia de COVID-19 fez o mundo voltar sua atenção ao tratamento de doenças pulmonares.

A COVID-19 (sigla em inglês para *coronavirus disease 2019*) é o nome dado à doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (sigla em inglês para *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) causadora de diversos sintomas sistêmicos (majoritariamente sintomas respiratórios) que variam de paciente para paciente. Em geral, a doença se manifesta com sintomas gripais moderados (febre, fadiga, tosse, coriza, dificuldade para respirar, dentre outros), mas pode evoluir para um quadro de descontrole das reações inflamatórias que levam à perda total ou parcial das funções pulmonares, o que pode causar a morte (GRANT et al., 2020). Este processo de inflamação pulmonar súbita e rápida é conhecido como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), e a síndrome respiratória aguda grave (SRAG e sigla em inglês SARS) é causada especificamente pelos vírus da espécie SARS-CoV (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018). Outras condições que podem evoluir para a SDRA incluem a pneumonia, sepse, trauma físico, aspiração, inalação

de substâncias, pancreatite, queimaduras e transfusões de sangue (MATTHAY et al., 2019). De forma geral, a idade avançada, a presença de doenças pulmonares crônicas, histórico de tabagismo ou alcoolismo, diabetes, e doenças cardíacas configuram risco de progressão para a síndrome respiratória (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2022; LAVERY et al., 2020).

A Figura 1 mostra a estrutura de um alvéolo, que é onde ocorrem as trocas gasosas no pulmão. Em uma perspectiva patofisiológica das síndromes respiratórias, os processos inflamatórios provocam danos às células alveolares, em especial os pneumócitos, que são células epiteliais e podem ser do tipo 1 ou 2 (AT1 e AT2, das siglas em inglês para *alveolar type* 1 ou 2). Estas células compõem os alvéolos e são responsáveis por permitir a troca gasosa, produzir e manter o surfactante pulmonar, e reabsorver o excesso de fluidos da superfície alveolar. Não obstante, os sintomas das síndromes respiratórias incluem a dificuldade e cansaço para respirar, baixa oxigenação, disfunção do surfactante pulmonar e acúmulo de fluidos no pulmão (FANELLI; RANIERI, 2015). Em recém-nascidos, essa condição é chamada de síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SAR-RN). Neste caso, o desconforto respiratório não é causado por uma inflamação ou trauma, e sim, pela deficiência do surfactante pulmonar que gera o colapso dos pulmões (atelectasia). Geralmente essa condição é mais comum em bebês prematuros, uma vez que a produção do surfactante pulmonar só é significativa a partir de 35 semanas de gestação (NORTHWAY; ROSAN; PORTER, 1967).

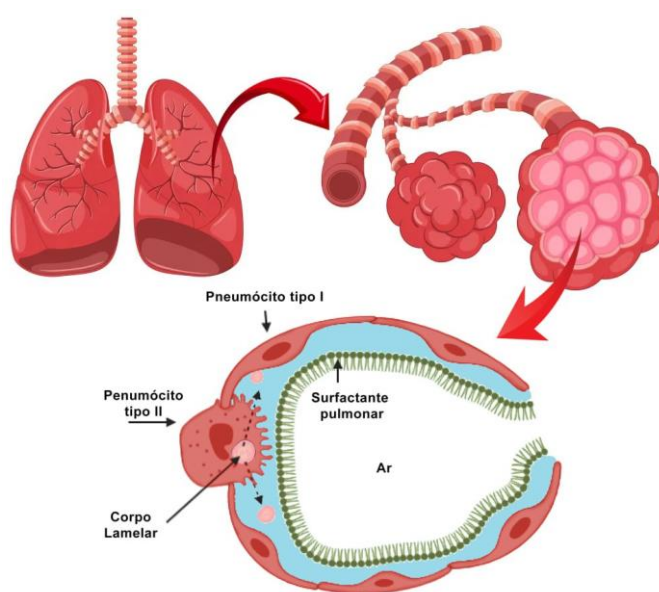


Figura 1. Estrutura de um alvéolo. Imagem adaptada e modificada de Vecteezy e Dziura (2021).

1.1. O surfactante pulmonar

O surfactante pulmonar (SP) é um fluido complexo composto por lipídeos e proteínas que se localiza em toda a extensão da interface ar/líquido dos alvéolos (Figura 2). Os pneumócitos tipo 2 são responsáveis pela secreção do SP através de organelas conhecidas como corpos lamelares (KNUDSEN; OCHS, 2018). Como o nome indica, o SP possui propriedades surfactantes (*surface-active agent*), isto é, possui atividade em superfície, o que resulta na diminuição da tensão superficial (γ) (BERNHARD, 2016). Essa propriedade é essencial para a respiração, pois resulta na diminuição da pressão de colapso do alvéolo, segundo a equação de Young-Laplace (Equação 1.1). A pressão de colapso (P_c) é definida como a pressão de equilíbrio do alvéolo (Figura 1) e sem o SP, a P_c aumenta com a diminuição do raio do alvéolo (r_a), o que resulta em uma tendência a um pulmão colapsado e em uma necessidade de maior esforço para a reinflação ou para a expiração. Com a presença do SP, a tensão superficial muda com o tamanho do alvéolo, resultando em uma pressão de colapso constante que, além de diminuir o esforço necessário para a reinflação, também uniformiza o tamanho dos alvéolos durante a respiração.

$$P_c = \frac{2\gamma}{r_a} \quad (1.1)$$

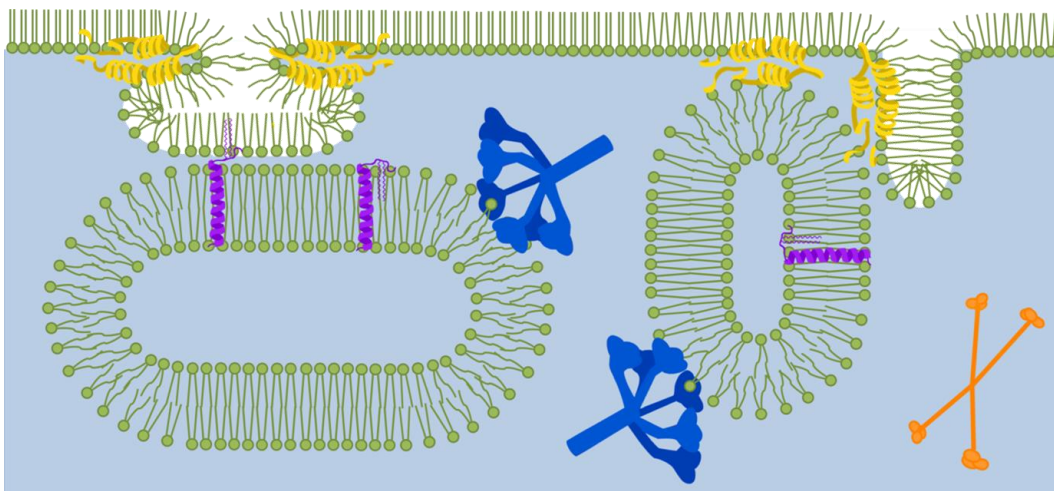


Figura 2. Representação do surfactante pulmonar. A região branca representa o ar e a região azul representa a fase aquosa. As esferas e bastões verdes representam os fosfolípidos e as estruturas azuis, amarelas, roxas e laranja representam respectivamente as proteínas do surfactante SP-A, SP-B, SP-C e SP-D.

Entre 70 e 80% da massa do surfactante pulmonar é composta de fosfolipídeos, e 10% são lipídeos neutros, como o colesterol (BAER et al., 2019; BERNHARD, 2016; NKADI; MERRITT; PILLERS, 2009). Dos fosfolipídeos, entre 70 e 80% são fosfatidilcolinas (PC), dentre as quais o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) é o mais abundante, compondo cerca de 50% do total de PCs. Entre 10 e 15% dos fosfolipídeos são aniônicos do tipo fosfatidilinositol (PI) ou fosfatidilglicerol (PG), como o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-2-fosfatidil-(1'-sn-glicerol) (DPPG). Outros fosfolipídeos como esfingomielinas e fosfatidiletanolaminas estão presentes em menores quantidades (OSELIERO FILHO et al., 2020a). A Figura 3 mostra as estruturas químicas do DPPC e do DPPG. É possível notar que as moléculas possuem uma região carregada (cabeça polar) e uma região de cadeias hidrocarbônicas (caudas apolares). Suas estruturas lhe conferem propriedades anfífilas, isto é, capazes de interagir tanto com meios polares (como o meio aquoso) quanto com meios apolares (como a fase gasosa), e essa propriedade é responsável pela atividade dessas moléculas em interfaces. A mistura de DPPC e DPPG em uma proporção de 7:3 costuma ser um bom modelo de surfactante pulmonar em trabalhos experimentais e de simulação (HONG ZHANG, QIHUI FAN, YI E. WANG, CHARLES R. NEAL, 2018; OSELIERO FILHO et al., 2020b; PARRA; PÉREZ-GIL, 2015; STACHOWICZ-KUŚNIERZ et al., 2022).

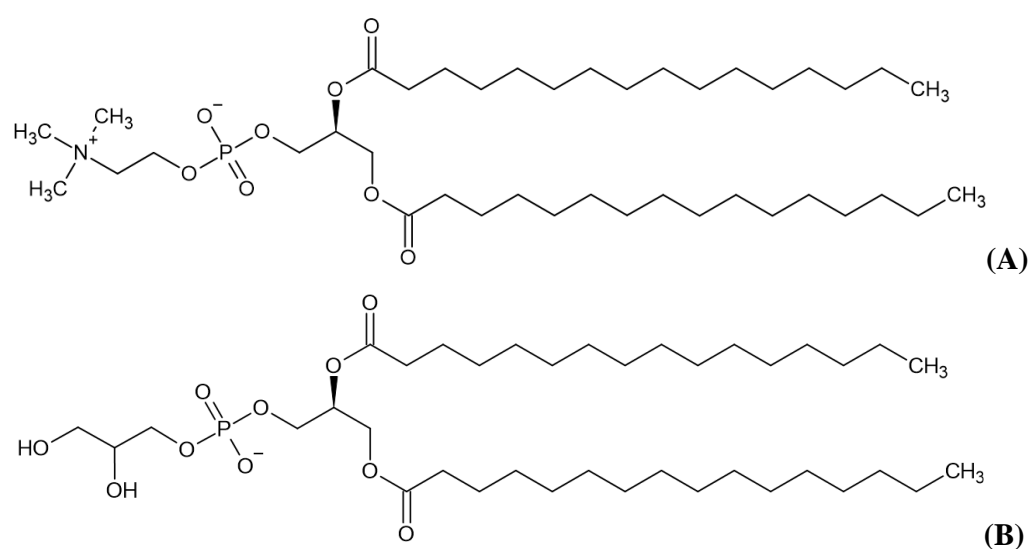


Figura 3. Estruturas químicas do DPPC (A) e DPPG (B).

Além disso, as proteínas do surfactante SP-A, SP-B, SP-C e SP-D compõem cerca de 10% da massa do surfactante pulmonar. As proteínas do surfactante desempenham tanto papel estrutural (SP-B e SP-C) quanto imune (SP-A e SP-D). As proteínas SP-B e SP-C estão mais associadas à fração lipídica do surfactante e são responsáveis pela formação dos corpos lamelares, conferir estabilidade extra ao surfactante, e carregamento de fosfolípidos de/para manutenção do filme. Já as proteínas SP-A e SP-D são glicoproteínas hidrofílicas que fazem parte do sistema imune inato, isto é, ligam-se imediatamente e de forma não específica a diversos patógenos que possam estar presentes durante a respiração, sinalizam e ativam macrófagos alveolares, e engatilham o processo de fagocitose (BAER et al., 2019; BERNHARD, 2016; NKADI; MERRITT; PILLERS, 2009).

1.2. Citocinas e o Fator de Necrose Tumoral (TNF)

As citocinas são pequenas proteínas sinalizadoras secretadas por células do sistema imunológico que desempenham um papel imunomodulador, isto é, são responsáveis pela regulação dos processos inflamatórios. Elas podem induzir ou inibir a inflamação (pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias) tanto interagindo com proteínas receptoras de células imune, quanto inibindo ou induzindo a ação de outras citocinas (ZHANG; AN, 2007). O fator de necrose tumoral (TNF, da sigla em inglês) é uma citocina majoritariamente pró-inflamatória associada à indução de febre, caquexia, apoptose e regulação positiva de processos inflamatórios no geral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Também está associada à sepse e à inibição de carcinogênese e replicação viral. Doenças autoimunes como psoríase, artrite reumatoide e doença de Crohn estão associadas com a desregulação positiva do TNF (ADEGBOLA et al., 2018; COATES et al., 2010; FARRUGIA; BARON, 2016; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; SANDS; KAPLAN, 2007; YOST; GUDJONSSON, 2009). A estrutura do TNF se encontra no anexo A.

O TNF foi identificado e isolado pela primeira vez por Carswell *et al.* no soro de camundongos infectados pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG) e/ou tratados com lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana de bactérias gram-negativas conhecido por induzir inflamação (CARSWELL et al., 1975). À época, estudava-se o efeito antitumoral da inoculação de organismos atenuados. Percebeu-

se que tanto o LPS quanto os microrganismos em si não eram responsáveis pela necrose de tecidos cancerígenos, e sim, a inflamação por estes induzida. Foi creditado ao TNF a propriedade de necrose tumoral, o que deu origem a seu nome. Trabalhos subsequentes mostraram a dificuldade do uso terapêutico do TNF devido às suas propriedades pirógenas (indução de febre) e inflamatórias em doses abaixo das doses terapêuticas (SPOONER; MARKOWITZ; SARAVOLATZ, 1992). A indução de apoptose pelo TNF pode ser responsável por suas propriedades antitumorais. Entretanto, não só existem tumores resistentes à ação do TNF, como também existem evidências de que o TNF pode estimular o crescimento e proliferação de alguns tumores (WANG; LIN, 2008). Por estar associada a diversos processos inflamatórios, a presença do TNF costuma ser considerada um marcador de inflamação (DIEZ-PINA et al., 2009; OE et al., 2015).

O TNF também está associado a doenças pulmonares inflamatórias, como asma, DPOC e SRAG (BARNES, 2008; LEE; YANG, 2013). Além disso, o TNF também parece ser uma peça-chave na síndrome respiratória causada pela COVID-19. Pacientes que necessitaram de unidade de tratamento intensivo (UTI) mostraram concentrações maiores de TNF (dentre outras citocinas) em relação aos pacientes que não necessitaram de UTI, e esse fato está sendo interpretado como uma “tempestade de citocinas”, que pode estar relacionado com as complicações da doença (COPERCHINI et al., 2020; DEL VALLE et al., 2020; FELDMANN et al., 2020; ROBINSON et al., 2020a). Estudos feitos pela Aliança Global de Reumatologia contra a COVID-19 mostram especificamente a importância da supressão do TNF no prognóstico da doença (ROBINSON et al., 2020b). Em um estudo com 600 pacientes que já utilizavam medicação contra doenças reumáticas, foi verificado que aqueles que utilizavam medicações supressoras de TNF possuíam menores taxas de admissão em hospitais (GIANFRANCESCO et al., 2020). Em um outro estudo com 77 pacientes que utilizavam medicações imunomoduladoras foi verificado que 48% precisou de ventilação mecânica e 12% foi a óbito, enquanto que nenhum dos pacientes utilizando medicações supressoras de TNF foi a óbito ou precisou de ventilação mecânica (WINTHROP et al., 2021).

Existem alternativas de alto custo disponíveis para o tratamento de doenças causadas pela desregulação do TNF, como o Infliximab® e o Etanercept® (JARVIS; FAULDS, 1999; MARKHAM; LAMB, 2000). Ambos os medicamentos

se ligam ao TNF e impedem sua ligação com seus receptores (TNFR1 e TNFR2), efetivamente inibindo sua sinalização pró-inflamatória. Entretanto, os medicamentos possuem severos efeitos colaterais.

1.3. Silenciamento genético: o siRNA

Uma alternativa promissora para o tratamento de diversas condições é a terapia de silenciamento genético utilizando ácidos ribonucleicos interferentes pequenos (da sigla em inglês siRNA). Os siRNAs são RNAs de dupla fita e de tamanho pequeno (em geral, até 25 bases nucleotídicas). São também chamados de RNA silenciadores pois degradam o RNA mensageiro (mRNA) alvo, impossibilitando a expressão de um determinado gene (ALSHAER et al., 2021; LAGANÀ et al., 2015; SUN; TANG; ULUDAG, 2013). Por esse motivo, o siRNA é altamente seletivo e específico, ligando-se apenas ao gene de interesse para o qual foi planejado.

A Figura 4 mostra o mecanismo de silenciamento do siRNA. Ao entrar na célula, o siRNA é inicialmente clivado (Fig. 4A) pela proteína chamada Dicer, da família de proteínas RNase III. Após a clivagem inicial (Fig. 4B), o siRNA encontra um complexo proteico chamado RISC (sigla do inglês para complexo silenciador induzido por RNA). Neste complexo encontra-se a proteína AGO-2, da família Argonauta, que separa as duas fitas do RNA e degrada a chamada fita passageira (Fig. 4C). Esta possui sequência de nucleotídeos idêntica à de uma seção do mRNA de interesse, e por isso é chamada de fita sentido. A fita remanescente possui sequência complementar de nucleotídeos (anti-sentido) e é chamada de fita guia pois é responsável por guiar o complexo RISC até o mRNA alvo (Fig. 4D). Ao ocorrer a ligação da fita guia com o mRNA, outras proteínas do complexo RISC são responsáveis por degradar o mRNA (Fig. 4E), impossibilitando sua tradução (ALSHAER et al., 2021; FAKHR; ZARE; TEIMOORI-TOOLABI, 2016).

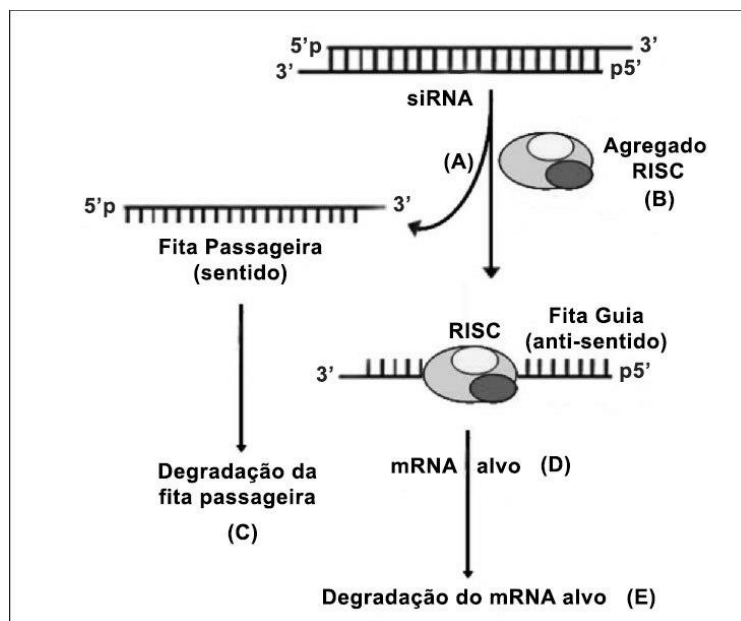


Figura 4. Mecanismo de ação do siRNA. As fitas do siRNA são separadas (A) pelo agregado RISC (B). A fita passageira é degradada e descartada (C) enquanto que a fita guia conduz o RISC até o mRNA alvo (D) para iniciar sua degradação (E). Imagem adaptada de Mendonça (2012)

O siRNA é um forte candidato para o desenvolvimento de terapias para doenças pulmonares inflamatórias, como as mencionadas, além de doenças imune, infecciosas e genéticas como fibrose cística e câncer (LEITE NASCIMENTO et al., 2016; NASCIMENTO; HILLIAIREAU; FATTAL, 2012). Porém, por ser um ácido nucleico de tamanho pequeno, o siRNA é rapidamente degradado por nucleases ao adentrar o meio biológico (SOUTSCHEK et al., 2004). Já ácidos nucleicos com tamanhos maiores do que 30 bases nucleotídicas causam reações imunes (RAJA; KATAS; AMJAD, 2019). Portanto, os principais desafios com relação ao desenvolvimento de terapias com siRNA residem na busca por carreadores, que permitam a sua proteção e liberação no alvo. O fármaco Patisiran® é o primeiro tratamento baseado em siRNA aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). para o tratamento da amiloidose de transtirretina, e utiliza nanopartículas lipídicas para o carregamento do siRNA (ADAMS et al., 2018; COELHO et al., 2013; LEDFORD, 2018).

1.4. Carreadores

Em geral, os carreadores utilizados para a transfecção, isto é, a introdução do ácido nucleico no interior da célula, costumam ser nanopartículas lipídicas, como

lipossomas, micelas e lipoplexos (BOFINGER et al., 2021; GHARAIBEH et al., 2021; GÜRCAN et al., 2021), que atuam através da fusão em membranas. Outros carreadores sugeridos na literatura são de origem polimérica (FATTAL; BARRATT, 2009; TOUB et al., 2006; YU et al., 2020). Nesse caso, devemos observar a carga do polímero, a sua biodegradabilidade e a sua biocompatibilidade no organismo humano. Outras alternativas são a transfecção viral e a modificação química da estrutura do RNA (KACZMAREK; KOWALSKI; ANDERSON, 2017). Bohr et al. avaliaram *in vivo* a utilização de um complexo dendrimérico positivamente carregado para a entrega de siRNA (BOHR et al., 2017). Nascimento et al. também utilizaram modelos *in vivo*, porém, utilizaram complexos lipídicos com ácido hialurônico (AH) para o silenciamento de células tumorais que expressam o CD44, receptor de AH, em excesso (LEITE NASCIMENTO et al., 2016). Stojceski et al. utilizaram dinâmica molecular para analisar a complexação siRNA-dendrímero e selecionar os melhores dendrímeros para a formação do nanocarreador (STOJCESKI et al., 2020).

De Backer et al. mostram que uma mistura complexa do siRNA com o nanocarreador e um surfactante pulmonar (SP) exógeno parece ser uma alternativa para o desenvolvimento de terapias para doenças respiratórias, de forma que a aplicação via inalação não compromete a eficiência da nanopartícula (NP) e nem do surfactante pulmonar endógeno natural (DE BACKER et al., 2015a). Trabalhos recentes realizados no Laboratório de Sistemas Complexos da PUC-Rio sugerem o encapsulamento de fármacos com nanocarreadores no desenvolvimento de novas terapias para doenças respiratórias. Foram estudadas as interações de diversas nanopartículas (NPs) com modelos de surfactante pulmonar através de dinâmica molecular e em experimentos em cuba de Langmuir (SOUZA et al., 2020a, 2018; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019).

Como os ácidos nucleicos possuem cargas negativas, é indispensável para a transfecção que as moléculas carreadoras possuam cargas positivas, como é o caso do fosfolípido DOTAP (N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil), N,N,N-trimetilamônio) (SIMBERG et al., 2004). Entretanto, essa propriedade contribui para o efeito citotóxico (FRÖHLICH, 2012), e uma das soluções para aplicação em lipossomas é a utilização de outros fosfolípidos, otimizando a proporção de forma a minimizar a citotoxicidade e maximizar a transfecção (KIM et al., 2017). Uma situação similar

ocorre com o polímero polietilenimina (PEI), $-\text{[CH}_2\text{--NH--CH}_2\text{]}_n-$. Por conter vários grupos amina secundárias, a densidade de cargas positivas é alta em pH fisiológico, resultando em uma boa capacidade de transfecção, mas uma alta toxicidade. Patil *et al.* sugerem a hidroxietilação intercalada do PEI, que reduz a densidade de carga e mantém a capacidade de transfecção *in vitro* (PATIL *et al.*, 2018).

Diaz *et al.* mostram que a utilização de PEI linear (Figura 5A) ou ramificado enxertado em polímeros hidrofóbicos é capaz de reduzir a citotoxicidade mantendo ou melhorando a capacidade de transfecção, e sugerem o uso de PEI linear de baixo peso molecular enxertado em polímeros hidrofóbicos, concluindo, entretanto, que a transfecção é menos eficiente neste caso apesar de a citotoxicidade ser reduzida (DIAZ *et al.*, 2021). Recentemente vários agentes de transfecção têm sido testados, como catiômeros (YANG *et al.*, 2021), polissacarídeos catiônicos (MUQUIER *et al.*, 2022), ciclodextrina enxertada com PEI (MOUSAZADEH; BONABI; ZARGHAMI, 2022), peptídeos KL4 (QIU *et al.*, 2021) e políplexos quaternários de nano-escala (WANG *et al.*, 2021). A tendência observada nestes exemplos é o enxerto ou copolimerização de polímeros policatiônicos em polímeros conhecidamente biocompatíveis, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG), cuja estrutura é mostrada na Figura 5B. O polímero PEI é considerado catiônico devido à presença do grupo amina (Figura 5A) que é protonado em pH fisiológico.

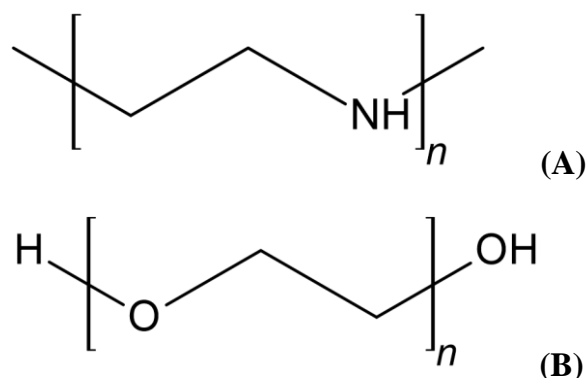


Figura 5. Estruturas do PEI (A) e do PEG (B).

Embora o desenvolvimento de fármacos à base de siRNA tenha sido um tópico de alto interesse nos últimos anos, informações a respeito de nanopartículas projetadas para interação direta com o tecido epitelial pulmonar ainda são escassas na literatura. Este tipo de terapia por inalação possui vantagens em relação à administração oral e intravenosa. Em uma administração oral, além de a

concentração do fármaco no organismo ser drasticamente reduzida através do metabolismo de primeira passagem (geralmente ocorre no intestino ou no fígado), a dispersão do fármaco no organismo é maior. A administração intravenosa costuma ser mais eficiente e necessita de uma menor concentração do fármaco, porém, além do problema da dispersão no organismo, o fármaco sofre reduções na concentração devido a filtração renal, agregação devido a proteínas do soro sanguíneo e, no caso do siRNA, maior interação com nucleases. Pelo fato de a administração direta no pulmão evitar todas essas dificuldades, existem relatos na literatura de aplicações bem sucedidas de siRNA sem o auxílio de carreadores apesar da importância do carreador para evitar a sua degradação (FELDMANN; MERKEL, 2015; LAM; LIANG; CHAN, 2012; MERKEL; KISSEL, 2012).

Das três formas de aplicação nas vias aéreas (inalação, nasal e intratraqueal) a inalação é a menos invasiva. Porém, o tamanho das nanopartículas deve ser controlado durante a formulação, uma vez que este é o principal fator que define a localização do fármaco no trato respiratório. Outros pontos a se considerar são a atividade imunológica da superfície pulmonar e a presença do SP (FELDMANN; MERKEL, 2015). O estudo da interação de fármacos e nanopartículas com o surfactante pulmonar é essencial, uma vez que uma interação malsucedida poderia danificar este, causando problemas respiratórios. Uma boa interação seria uma boa liberação do fármaco no tecido epitelial alveolar. Dados experimentais sugerem que NPs formam as chamadas “coroas” ao interagir com o SP, isto é, estruturas complexas formadas pela nanopartícula e por fosfolipídeos e proteínas do surfactante. As proteínas SP-A, SP-B e SP-C estão relacionadas com uma adsorção de partículas expostas ao SP, o que pode liberar a partícula no interior dos alvéolos (DE BACKER et al., 2015a; GUAGLIARDO et al., 2021). Esse fenômeno pode remover fosfolipídeos do SP, comprometendo sua função, e pode também gerar uma resposta imune indesejada. Além disso, o surfactante costuma desestabilizar nanopartículas carregadas positivamente, uma vez que este costuma ser carregado negativamente (DE BACKER et al., 2015a; FELDMANN; MERKEL, 2015).

De qualquer forma, estudos nesta área têm mostrado resultados positivos. Jensen *et al.* mostram que é possível produzir uma formulação de partículas de PLGA (sigla em inglês para poli[ácido lático-co-ácido glicólico]) otimizadas para aerossolização e inalação que não comprometem a atividade do siRNA (JENSEN

et al., 2010). De Backer *et al.* mostram que o potencial silenciador de nanogéis de dextrano e siRNA é mantido, mesmo após interagirem com o SP. Surpreendentemente, a presença do SP reduz a transfecção do nanogel, mas mantém a capacidade de silenciamento genético (DE BACKER et al., 2013). Em estudos *in vivo*, De Backer *et al.* ainda mostram que os nanogéis formulados com uma cobertura de surfactante pulmonar são os mais eficazes no silenciamento genético, mostrando também o impacto imunológico da aplicação (DE BACKER et al., 2015b). Merckx *et al.* demonstram a capacidade de liofilização e nebulização de certas nanopartículas cobertas com SP cuja eficácia já fora comprovada (MERCKX et al., 2020).

Simulações em dinâmica molecular (DM) também foram utilizadas para o estudo de diversas formulações de NPs. Stojceski *et al.* utilizaram dinâmica molecular *coarse-grained* (CG) para estudar a formação de nanopartículas de dendrímeros funcionalizados para o carregamento de siRNA (STOJCESKI et al., 2020). Pirhadi e Amani utilizaram DM-CG para simular uma nanoemulsão contendo siRNA e cloreto de benzalcônio (PIRHADI; AMANI, 2020). Bono *et al.* simularam várias nanopartículas de PEI de diferentes pesos moleculares, formas de protonação, ramificação e razão amina-fosfato (N/P) (BONO et al., 2021). Lu *et al.* simularam a transfecção de siRNA carregado por PMAL (poli[anidrido-alt-1-deceno maleico]) em membranas, correlacionando com o valor calculado da energia livre de Gibbs do processo (LU et al., 2018).

2. Objetivos

O objetivo deste projeto é realizar simulações de dinâmica molecular para estudar as interações de NPs poliméricas com siRNA anti-TNF encapsulado com modelos de SP na interface gás-líquido.

2.1. Objetivos Específicos

- Construir dois modelos de surfactante pulmonar contendo apenas DPPC ou DPPC e DPPG na proporção 7:3 para avaliar o efeito das cargas na transposição das NPs através do modelo de SP;
- Construir NPs poliméricas contendo os polímeros PEI e PEG;
- Realizar simulações de dinâmica molecular em um campo de força *coarse-grained* (CG) para avaliar a interação de NPs de siRNA contendo: i) apenas o siRNA; ii) PEI; iii) PEG; iv) PEI e PEG na proporção de 1:1;
- Avaliar o impacto da transposição das NPs nos modelos de surfactante pulmonar utilizando software de visualização e análises de parâmetro de ordem das cadeias fosfolipídicas;
- Calcular a energia livre de Gibbs (ΔG) do processo de transposição da NP da fase gasosa até a fase aquosa utilizando o método de amostragem guarda-chuva;
- Elencar as limitações do campo de força CG utilizado.

3. Fundamentação Teórica

3.1. Dinâmica Molecular e campos de força

A dinâmica molecular (DM) é uma robusta ferramenta de química computacional utilizada para a simulação de sistemas físico-químicos complexos em um nível microscópico (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Este método é amplamente utilizado para simulação de sistemas farmacológicos, biofísicos e bioquímicos (BASTOS et al., 2019; ORTIZ-COLLAZOS et al., 2017), além de também possuir aplicações em estudos de estruturas cristalinas e compostos de coordenação (OLIVEIRA et al., 2022; TRIBELLO et al., 2009). Os resultados observados em escala atomística são úteis para inferir propriedades macroscópicas e prever o comportamento de sistemas reais, especialmente quando aliados a resultados experimentais (ADCOCK; MCCAMMON, 2006; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Com exceção da utilização de um campo de força CG na DM que será discutido mais adiante, o sistema de interesse é simulado em escala atômica e o movimento dos átomos é descrito através da mecânica clássica (ABRAHAM et al., 2024). Em resumo, a DM resolve a equação de Newton para o movimento de um sistema de N átomos:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1 \dots N \quad (3.1)$$

onde r_i é a posição de um dado átomo i , m_i sua massa e F_i a força atuante em um tempo de simulação t . As forças F_i atuantes em cada átomo são calculadas através da derivada negativa do potencial V , que é fornecido pelo campo de força:

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (3.2)$$

O uso da mecânica clássica implica na impossibilidade da simulação de certos processos essencialmente quânticos, como por exemplo uma transferência de elétrons e formação/quebra de ligação química. O movimento de um átomo desconsidera o movimento dos elétrons em relação ao núcleo e as ligações químicas são consideradas osciladores harmônicos clássicos. Na grande maioria dos casos, essas aproximações são adequadas e a decisão do uso da DM clássica deve

considerar essas limitações. Caso contrário, deve-se utilizar a DM quântica. Para estudar sistemas no nível atomístico onde efeitos quânticos não são significativos, a DM pode ser a técnica de escolha.

Para a DM, o movimento dos átomos depende de sua posição e de sua relação com outros átomos, o que é descrito pelo potencial V . Este é definido como o somatório de todos os potenciais devido às interações ligadas (V_L) e não ligadas (V_{NL}) presentes no sistema:

$$V = \sum V_L + \sum V_{NL} \quad (3.3)$$

O potencial de interações ligadas V_L atua sobre átomos que estão ligados diretamente por uma ligação química (V_B) ou indiretamente, seja em função de uma deformação angular (V_θ), ou em função de diedros de torção, que por sua vez possui contribuição dos diedros próprios (V_ϕ) e impróprios (V_ω) (CRAMER, 2004). A Figura 6 ilustra as interações ligadas.

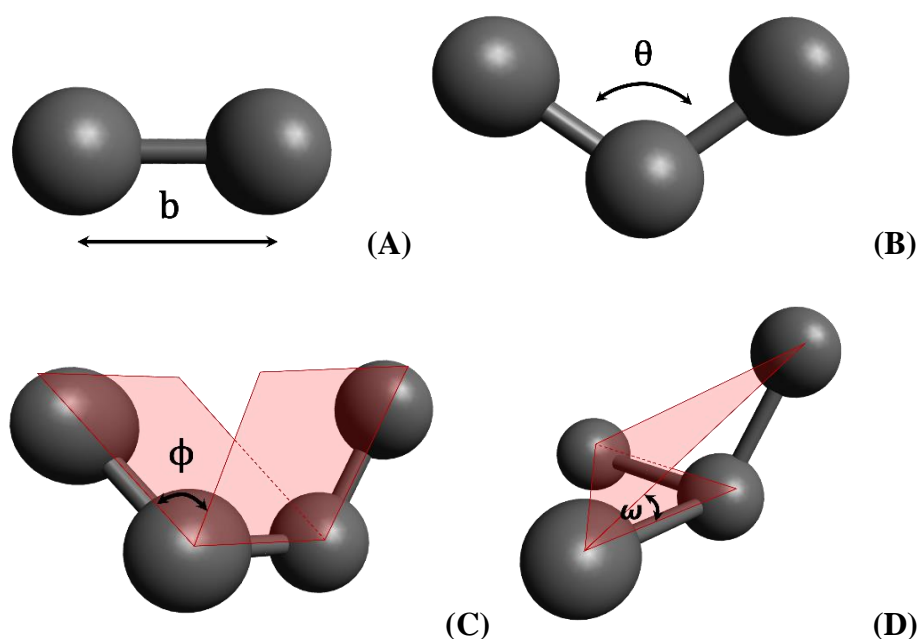


Figura 6. Interações ligadas. (A) Ligação química de tamanho b entre dois átomos; (B) Deformação angular θ entre três átomos ligados; (C) Torção de uma ligação definida pelo diedro próprio ϕ entre os planos das ligações de quatro átomos e (D) Torção definida pelo diedro impróprio ω entre quatro átomos.

Em geral, uma ligação covalente entre dois átomos i e j é considerada um potencial harmônico:

$$V_B(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (3.4)$$

onde r_{ij} é a distância entre os átomos, b_{ij} a distância de equilíbrio e k_{ij}^b a constante de força da ligação. Os parâmetros b_{ij} e k_{ij}^b são fornecidos pelo campo de força e dependem dos pares de átomos envolvidos na ligação.

A deformação angular entre três átomos i, j e k também é descrita por um potencial harmônico:

$$V_\theta(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (3.5)$$

onde θ_{ijk} é o ângulo entre os átomos, θ_{ijk}^0 o ângulo de equilíbrio e k_{ijk}^θ a constante de força do ângulo. Os parâmetros θ_{ijk}^0 e k_{ijk}^θ são fornecidos pelo campo de força.

Os diedros impróprios também são normalmente descritos por um potencial harmônico:

$$V_\omega(\omega_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\omega (\omega_{ijk} - \omega_{ijk}^0)^2 \quad (3.6)$$

onde ω_{ijkl} é o diedro impróprio, ω_{ijk}^0 o diedro de equilíbrio e k_{ijk}^ω a constante de força da torção. A implementação de diedros impróprios é importante para a manutenção de uma configuração em caso de quiralidade.

Na maioria dos casos, o potencial de um diedro próprio entre os átomos i, j, k e l é descrito por:

$$V_\phi(\phi_{ijkl}) = k_{ijkl}^\phi (1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^s)) \quad (3.7)$$

onde ϕ_{ijkl} é o diedro, k_{ijkl}^ϕ a constante de força, n a multiplicidade e ϕ_{ijkl}^s é a fase.

São consideradas interações não-ligadas aquelas entre qualquer par de átomos que não pertençam à mesma molécula ou estejam a mais de 3 ligações de distância, e que estejam a uma distância menor que um raio de corte que pode ser modificado pelo usuário. A interação não-ligada entre um par de átomos i e j é descrita pelo potencial de Lennard-Jones (V_{LJ}):

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \quad (3.8)$$

onde $C_{ij}^{(12)}$ é a constante do termo repulsivo e $C_{ij}^{(6)}$ é a constante do termo atrativo. Para uma interação não-ligada onde há a presença de cargas (tanto formais quanto parciais) utiliza-se (além do potencial de Lennard-Jones) o potencial eletrostático de Coulomb (V_c):

$$V_c(r_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (3.9)$$

onde q_i e q_j são as cargas, ϵ_r é a constante dielétrica do meio, que pode ser modificada pelo usuário, e $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$, onde ϵ_0 é a permissividade no vácuo.

É importante mencionar que realizar o cálculo das forças de interações não-ligadas para átomos com distância acima do raio de corte possui alto custo computacional. Entretanto, uma queda abrupta para zero no raio de corte viola a conservação de energia. Por esse motivo, os potenciais são deslocados por uma constante de forma que o potencial seja zero a partir do raio de corte mantendo o formato da função. Essa aproximação não impacta as forças individuais agindo em cada átomo, mas superestima as mudanças na energia potencial do sistema. Mais adiante (Cap. 3.3.1) será discutido o algoritmo utilizado para o cálculo de interações eletrostáticas de longo alcance que contorna este problema.

Além disso, existem certas modificações nas equações dos potenciais acima (tanto ligados quanto não-ligados) que descrevem melhor algumas situações específicas. O campo de força é responsável por fornecer os valores das constantes dos potenciais de cada interação possível entre átomos (KAMINSKI et al., 1994; KAMINSKI; JORGENSEN, 1996). Para isso, se faz uma parametrização das ligações e interações não-ligadas entre átomos, além de ângulos e diedros de estruturas básicas como aminoácidos, hidrocarbonetos e outras funções orgânicas (KAMENIK et al., 2020; XIA; CHAI; WANG, 2017). Os campos de força diferem na metodologia empregada para a parametrização (métodos quânticos *ab initio* ou dados experimentais) e no nível de detalhamento, que pode ser *all-atom* (AA), *united-atom* (UA) ou *coarse-grained* (CG) (MCDONALD; JORGENSEN, 1998; SMONDYREV; BERKOWITZ, 1999). Enquanto os campos de força AA simulam todos os átomos, incluindo átomos de hidrogênio, os campos de força UA simulam os átomos de hidrogênios incorporados em um pseudo-átomo. Por exemplo, um

campo de força AA simula todos os átomos de um grupo metila ($-\text{CH}_3$), enquanto um campo de força UA simula o mesmo grupo como uma única partícula.

Os campos de força AA e UA são chamados de atomísticos, e como exemplo temos: AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement), CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics), GROMOS (GRONingen MOlecular Simulation) e OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations) (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; SCHULER; DAURA; VAN GUNSTEREN, 2001; VANOMMESLAEGHE et al., 2010; VANOMMESLAEGHE; MACKERELL, 2012; WANG et al., 2004).

3.2. O campo de força *coarse-grained*

Os campos de força CG fazem uma aproximação ainda mais drástica. O campo de força MARTINI agrupa em média quatro átomos pesados em uma única partícula (costumeiramente chamada de “grão”) à qual é atribuída a um dos quatro rótulos possíveis: Q para grãos carregados (cargas formais), P para grãos polares, N para grãos anfifílicos e C para grãos apolares (em geral, seções de cadeias hidrocarbônicas), ilustrados na Figura 7 (MARRINK et al., 2007). Cada tipo de grão possui quatro ou cinco subdivisões que representam um ajuste fino na afinidade polar (1-5) ou na natureza química em relação à capacidade de realizar ligações de hidrogênio (a: grupo aceptor; d: grupo doador; da: grupo doador e aceptor; 0: sem ligações de hidrogênio).

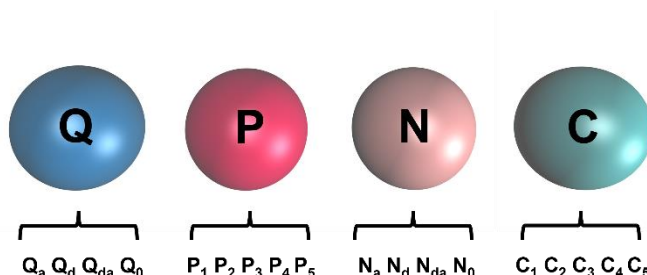


Figura 7. Tipos de grãos do campo de força MARTINI.

Neste campo de força todos os grãos de seções acíclicas possuem a mesma massa de 72 u.a. Os grãos que representam seções cíclicas de compostos orgânicos possuem massa de 45 u.a. pois representam 2 ou 3 átomos pesados no máximo, e

levam a letra “S” em seu rótulo antes de seu tipo. Cargas parciais também não são suportadas. O potencial utilizado para representar deformações angulares é harmônico do tipo cosseno (Eq. 3.10) e o potencial para interações de Van der Waals é o potencial de Lennard-Jones deslocado (3.11).

$$V_{\theta}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^{\theta} (\cos \theta_{ijk} - \cos \theta_{ijk}^0)^2 \quad (3.10)$$

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.11)$$

onde σ_{ij} representa a menor distância entre o par de partículas e ϵ_{ij} representa a intensidade da interação. A ideia do campo de força é utilizar um total de 18 tipos de partículas como blocos para construção de qualquer tipo de biomolécula. Para isso, o valor ϵ_{ij} é parametrizado para todas as $18 \cdot 18 = 324$ interações possíveis. O valor de σ_{ij} é de 0,47 nm para a maioria das interações, exceto entre grãos carregados (Q) e grãos apolares (C), onde σ_{ij} é 0,62 nm, e grãos do tipo S, onde σ_{ij} é de 0,43 nm. Os valores de ϵ_{ij} variam entre 2,0 e 5,6 kJ mol⁻¹ dependendo da interação. Para uma interação entre dois grãos do tipo S, o valor de ϵ_{ij} é reduzido em 75 % em relação ao valor original. Para grãos normais interagindo com grãos S, os valores de σ_{ij} e ϵ_{ij} não mudam. O MARTINI também conta com um modelo de água polarizável (YESYLEVSKYY et al., 2010) que não foi utilizado neste projeto devido às dificuldades de ajuste de parametrização de outras moléculas.

A versão do campo de força utilizada neste projeto é o MARTINI 2.0, que conta com parametrizações de diversas biomoléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e até mesmo polímeros (GRUNEWALD et al., 2018; JONG et al., 2012; LO et al., 2009; MONTICELLI et al., 2008; UUSITALO et al., 2017). Já a versão mais recente, MARTINI 3.0, não possui parametrização para todas as biomoléculas utilizadas neste projeto, sendo o motivo de não ser utilizada. Para uma determinada molécula, a escolha do tipo de grãos é baseada nas funções químicas que compõem o grão, etapa chamada de mapeamento. A validação desse modelo ocorre com a comparação de suas propriedades com propriedades obtidas de simulações atomísticas ou propriedades experimentais. A molécula de DPPC, por exemplo, foi validada através da análise de curvatura lipídica espontânea (comparada com estimativas experimentais), perfis de estresse de bicamadas,

simulações de transformações lamelar-micelares e cálculos de energia livre de dessorção lipídica (comparadas com resultados de simulações atomísticas) (MARRINK et al., 2007). A Figura 8 ilustra o mapeamento oficial de algumas moléculas:

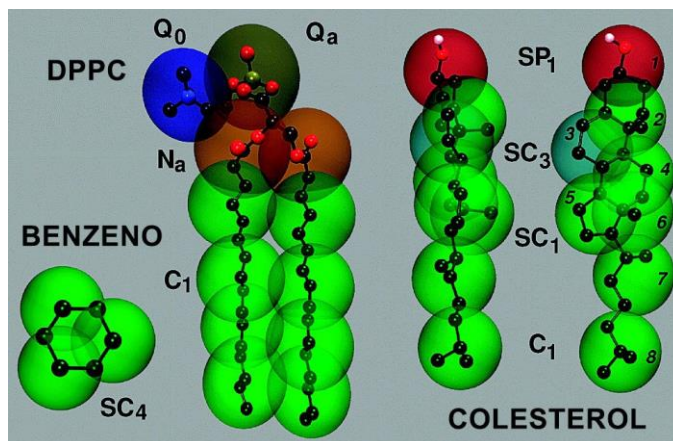


Figura 8. Mapeamento e parametrização das moléculas de benzeno, DPPC, e colesterol no campo de força MARTINI. Figura adaptada de Marrink (2007)

O principal benefício do uso de um campo de força CG é o custo computacional muito inferior comparado ao uso de campo de força atomístico. As aproximações permitem que menos cálculos sejam realizados, tornando possível a simulação de sistemas maiores e o uso de tempos de simulação maiores. Porém, uma clara desvantagem é a perda de informações e detalhes que podem ser obtidos com simulações atomísticas. Cabe ao usuário decidir a melhor técnica que melhor se adequa às informações que busca. Por exemplo, para estudar interações de macromoléculas com filmes lipídicos, os graus de liberdade atomísticos e informações conformacionais precisas podem não ser tão relevantes. Infelizmente, nos últimos anos, o campo de força MARTINI 2.0 demonstrou possuir limitações em sua parametrização (ALESSANDRI et al., 2019; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2020). Foram relatados resultados que indicam que o campo de força superestima a agregação de proteínas, reproduz incorretamente a miscibilidade de solventes, o coeficiente de partição ($\log_{10} P$) de certas moléculas é superestimado, e não simula corretamente cavidades proteicas (BEREAU; KREMER, 2015; JAVANAINEN; MARTINEZ-SEARA; VATTULAINEN, 2017; STARK; ANDREWS; ELCOCK, 2013). Nosso laboratório mostrou que o $\log_{10} P$ calculado usando os modelos de DPPC e colesterol parametrizados pelo MARTINI 2.0 não

concordam com os valores obtidos experimentalmente (FORNASIER et al., 2020; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2020; SOUZA et al., 2020c). A nova versão do MARTINI, versão MARTINI 3.0, foi desenvolvida para superar essas limitações (SOUZA et al., 2021), mas nosso laboratório demonstrou que o problema não foi resolvido (ALESSANDRI et al., 2019; SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2020). Apesar das limitações, o menor custo computacional deste campo de força continua sendo um grande motivador para o seu uso. Os resultados obtidos utilizando o campo de força MARTINI podem ser reproduzidos em simulações atomísticas para uma eventual validação. Neste trabalho, busca-se entender o impacto do tratamento teórico do MARTINI no potencial de força média das simulações.

3.3. Algoritmos

Escolhido o campo de força, é necessário que o usuário forneça ao programa de DM a configuração inicial do sistema que deseja simular, isto é, a posição de cada átomo/grão em um espaço cartesiano. Arquivos de coordenadas de moléculas podem ser obtidos de base de dados como o Protein Data Bank (PDB) ou dos *websites* dos próprios campos de força (BERMAN, 2000). Definido o sistema, seus componentes e seus limites, o programa aplica condições periódicas de contorno (Cap. 3.3.1) para a realização dos cálculos. O sistema deve ser submetido às etapas de minimização de energia (Cap. 3.3.2) e equilíbrio de temperatura (Cap. 3.3.3) e pressão (Cap. 3.3.4) para fornecer informações a respeito da velocidade inicial e posição dos átomos do sistema. Munido das condições iniciais, os algoritmos de integração (Cap. 3.3.5) são usados para atualização das velocidades e posições, gerando uma trajetória.

3.3.1. Ensembles e condições periódicas de contorno

Um *ensemble* é uma ferramenta da mecânica estatística que consiste no tratamento de \tilde{N} réplicas do sistema em todas as direções. Devido ao contato entre as réplicas, é possível haver transferência de energia e matéria. As propriedades do sistema dependem do ensemble utilizado. Por exemplo, no ensemble canônico (NVT) o número de moléculas (N), o volume do sistema (V) e a temperatura (T)

são mantidos constantes. A função de partição Q de um ensemble NVT é dada pelo somatório das funções de partição dos microestados i do sistema:

$$Q(N, V, T) = \sum_i^{\tilde{N}} e^{-\frac{E_i}{k_b T}} \quad (3.12)$$

onde E_i é a energia do microestado e k_b é a constante de Boltzmann. Também podemos definir o ensemble canônico em um espaço de fase r :

$$Q(N, V, T) = \int e^{-\frac{E(r)}{k_b T}} d^n r \quad (3.13)$$

Para o ensemble canônico, o espaço de fase r consiste na coleção dos momentos e posições generalizadas de um sistema com n graus de liberdade internos.

Em um ensemble isotérmico-isobárico (NPT), além de N e T constantes, a pressão (P) também é constante. A função de partição de um ensemble NPT é dada pela soma ponderada da função de partição canônica:

$$Q(N, P, T) = \int Q(N, V, T) e^{-\frac{PV}{k_b T}} C dV \quad (3.14)$$

onde $C = \frac{N}{V} = \frac{P}{k_b T}$ é um fator de normalização. Existem também os ensembles microcanônico (NVE) e grande canônico (μVT) onde respectivamente a energia do sistema (E) e o potencial químico (μ) do sistema são mantidos constantes. Para os processos estudados neste projeto, os ensembles NVT e NPT são os mais importantes pois são utilizados no acoplamento de temperatura (Cap. 3.3.3) e pressão (Cap. 3.3.4) respectivamente. Além disso, esses dois ensembles estão respectivamente associados às energias livre de Helmholtz (F) e Gibbs (G) (Cap. 3.4).

Para minimizar o custo computacional, os programas de DM costumam fazer $\tilde{N} = 1$, isto é, consideram apenas as réplicas vizinhas em cada direção para o cálculo de interações não-ligadas de curto alcance. Essa é a condição periódica de contorno utilizada pelo programa, e possui o benefício de eliminar os artefatos que seriam causados pelos limites do sistema. Os artefatos causados pela periodicidade são bem menores, especialmente em sistemas isotrópicos. A célula unitária que

representa o sistema periódico é chamada de caixa. A Figura 9 ilustra a periodicidade de um sistema.

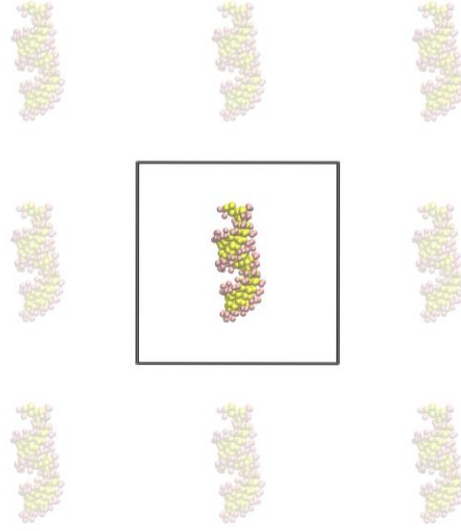


Figura 9. Periodicidade em um sistema contendo uma molécula de siRNA no campo de força MARTINI.

Para o cálculo de interações não-ligadas de longo alcance, apenas uma imagem em cada direção pode não ter a precisão necessária. O potencial eletrostático, por exemplo, é dado por:

$$V_c = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij,n}} \quad (3.15)$$

onde $n = (n_x, n_y, n_z)$ é o vetor índice da caixa do sistema. A soma de Ewald é o método histórico utilizado para o cálculo de interações de longo alcance em um sistema isotrópico:

$$V_C = V_{dir} + V_{rec} + V_0 \quad (3.16)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} V_{dir} = \frac{f}{2} \sum_{i,j}^N \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta r_{ij,n})}{r_{ij,n}} \\ V_{rec} = \frac{f}{2\pi V} \sum_{i,j}^N q_i q_j \sum_{m_x} \sum_{m_y} \sum_{m_z^*} \frac{e^{-\left(\frac{\pi m}{\beta}\right)^2 + 2\pi i m(r_i - r_j)}}{m^2} \\ V_0 = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i^N q_i^2 \end{array} \right. \quad (3.17)$$

onde V_{dir} representa o potencial de interações de curto alcance, um somatório que converge rapidamente no espaço real, e V_{rec} diz respeito às interações de longo alcance periódicas. O somatório que converge rapidamente no espaço recíproco ao qual é aplicado a transformada de Fourier. V_0 é uma constante que mantém a neutralidade da célula unitária. β é o peso relativo entre as somas direta e recíproca; $m = (m_x, m_y, m_z)$ é o vetor índice no espaço recíproco, e V é o volume da caixa. A função erro complementar $erfc$ é definida por $erfc(x) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$. Algumas modificações na soma de Ewald são implementadas no PME (Particle Mesh Ewald), que é um algoritmo mais rápido e menos custoso computacionalmente. Ao invés de operar em vetores, o PME opera em partículas arranjadas em uma malha no espaço. Desta forma, é possível realizar a transformada rápida de Fourier (FFT) no componente V_{rec} . Vale lembrar que esse algoritmo também é válido para o potencial de Lennard-Jones (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993; ESSMANN et al., 1995).

3.3.2. Minimização de energia

Definidos os componentes do sistema e seus limites (e, portanto, as condições periódicas de contorno), é necessário minimizar a energia potencial do sistema para evitar possíveis sobreposições de átomos/grãos. Um sistema com a menor energia potencial possível significa um sistema mais próximo do equilíbrio e com forças de menor magnitudes possíveis (BINDER et al., 2004; HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). A energia potencial do sistema é uma função das posições de todos os átomos do sistema (r), e o valor mínimo local ocorre quando o gradiente (Eq. 3.2) possui coordenadas iguais a zero e a matriz Hessiana (matriz das derivadas de segunda ordem) possui todos os autovalores positivos. O algoritmo mais conhecido e consolidado para a procura de mínimos locais de uma função é o *steepest descent*:

$$r_{n+1} = r_n + \frac{F_n}{\max(|F_n|)} h_n \quad (3.18)$$

Para atualizar as posições dos átomos (r_{n+1}), as posições do passo anterior r_n são somadas a um fator de deslocamento h_n multiplicado pelas forças (F_n) normalizadas pela maior força atuando em um dado átomo naquele passo

$\max(|F_n|)$. As novas posições r_{n+1} são aceitas caso $V_{n+1} < V_n$ e rejeitadas caso contrário. O valor inicial do fator h_n costuma ser de 0,01 nm (podendo ser modificado pelo usuário) e é atualizado a cada passo segundo as condições:

$$h_{n+1} = \begin{cases} 1,2h_n, & V_{n+1} < V_n \\ 0,2h_n, & V_{n+1} \geq V_n \end{cases} \quad (3.19)$$

Dessa forma, as posições dos átomos/grãos do sistema são atualizadas a cada passo na direção de energias potenciais cada vez menores. O algoritmo é interrompido quando não há mais mudanças significativas na energia ou quando a força máxima passa a ser menor que um valor definido pelo usuário. Além do steepest-descent, existem outros algoritmos mais robustos, porém mais custosos, como o gradiente conjugado ou o minimizador quasi-Newtoniano de memória limitada de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (l-bfgs) (BYRD et al., 1995; ZIMMERMANN, 1991).

3.3.3. Acoplamento de temperatura

Para resolver a equação diferencial de segunda ordem de Newton (Eq. 3.1) são necessárias duas condições iniciais: as posições e velocidades dos átomos. A etapa de equilibração de temperatura é responsável por fornecer as velocidades iniciais. Primeiro, velocidades iniciais (v_i) aleatórias são geradas segundo a distribuição de Boltzmann a uma dada temperatura (T) (VERLET, 1967):

$$b(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_b T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_b T}} \quad (3.20)$$

Após gerar velocidades aleatórias, os movimentos dos centros de massa são removidos e as velocidades são reescaladas para que a energia cinética do sistema corresponda à temperatura desejada. Conhecidas as condições iniciais, é executada uma pequena simulação em um ensemble NVT para o equilíbrio da temperatura. O acoplador de temperatura (ou termostato) é o algoritmo responsável para garantir o controle da temperatura desejada. O acoplador de Berendsen corrige a temperatura de acordo com uma cinética de primeira ordem (BERENDSEN, 1991):

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (3.21)$$

Segundo a eq. 3.21, um desvio de temperatura $T_0 \rightarrow T$ decai exponencialmente com um fator τ , chamada constante de acoplamento de temperatura. Além disso, a energia cinética (E_k) também é corrigida:

$$\Delta E_k = (\lambda - 1)^2 E_k \quad (3.22)$$

onde λ é o fator de escalonamento dependente do tempo que está associando com o fluxo de calor do sistema causado pelo escalonamento de velocidades (BERENDSEN, 1991):

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{n_{TC} \Delta T}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T \left(t - \frac{1}{2} \Delta t \right)} - 1 \right)} \quad (3.23)$$

Sendo n_{TC} o número de passos do acoplamento e τ_T está associado com a constante de acoplamento de temperatura τ da seguinte forma:

$$\tau = \frac{2C_V \tau_T}{N_{df} k_b} \quad (3.24)$$

onde C_V é a capacidade térmica e N_{df} o número de graus de liberdade. Por suprimir as flutuações da energia cinética, o termostato de Berendsen não gera um ensemble NVT apropriado. O termostato de redimensionamento de velocidade (v-rescale) é recomendado para uma distribuição correta da energia cinética e geração correta do ensemble. O algoritmo conta com algumas modificações no termostato de Berendsen, especialmente com relação a distribuição de energia cinética (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007).

$$dE_k = (E_{k0} - E_k) \frac{dt}{\tau_T} + 2 \sqrt{\frac{E_k E_{k0}}{N_{df}}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (3.25)$$

onde E_k é a energia cinética e dW é o termo conhecido como processo de Wiener. Outros termostatos como o de Andersen ou o de Nosé-Hoover também podem ser utilizados, sendo este último preferível para a simulação final após as etapas de equilibração (BASCONI; SHIRTS, 2013; HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984).

3.3.4. Acoplamento de pressão

O tensor pressão P é calculado a partir da diferença entre a energia cinética E_k e o tensor do virial Ξ :

$$P = \frac{2}{V}(E_k - \Xi) \quad (3.26)$$

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} \otimes F_{ij} \quad (3.27)$$

Com o acoplamento de pressão, o ensemble NPT é implementado no sistema. Assim como no acoplamento de temperatura (Cap. 3.3.4), os conceitos de reescalonamento de Berendsen também servem para o acoplamento de pressão (BERENDSEN et al., 1984). O barostato de Berendsen reescalona a caixa do sistema a partir de uma constante de tempo τ_P e segundo uma matriz de escalonamento μ_P :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad (3.28)$$

$$\mu_P = \delta_{ij} - \frac{n_{PC} \Delta t}{3\tau_P} \kappa_{T,ij} (P_{0,ij} - P_{ij}(t)) \quad (3.29)$$

onde $\kappa_{T,ij}$ é a compressibilidade isotérmica do sistema, δ_{ij} é a função delta de Kronecker e n_{PC} o número de passos. O reescalonamento da caixa e das posições gera um trabalho realizado no sistema, uma vez que as velocidades não são reescaladas. Para conservar a energia do sistema, este trabalho é subtraído:

$$-\sum_{i,j} (\mu_{P,ij} - \delta_{ij}) P_{ij} V = \sum_{i,j} 2(\mu_{P,ij} - \delta_{ij}) \Xi_{ij} \quad (3.30)$$

Também em paralelo com o termostato v-rescale, existe o barostato de redimensionamento estocástico de célula (c-rescale) (BERNETTI; BUSSI, 2020).

$$d\left(\log \frac{V}{V_0}\right) = -(P_0 - P) \frac{\kappa_T}{\tau_P} dt + \sqrt{\frac{2k_b \kappa_T T}{V \tau_P}} dW \quad (3.31)$$

onde κ_T é a compressibilidade isotérmica do sistema. O barostato correspondente ao termostato de Nosé-Hoover é o Parrinello-Rahman, que da mesma forma, é mais acurado para descrever um ensemble NPT isotrópico (NOSÉ; KLEIN, 1983;

PARRINELLO; RAHMAN, 1981). O acoplamento de tensão superficial é de particular interesse para simulações de modelos de surfactante pulmonar. A tensão superficial γ é dada por:

$$\gamma(t) = \frac{L_z}{n} \left(P_{zz}(t) - \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right) \quad (3.32)$$

onde P_{xx} , P_{yy} , e P_{zz} representam as componentes da pressão nas respectivas direções, L_z é o tamanho da caixa no eixo z e n é o número de superfícies. É importante mencionar que em simulações de modelos de SP são necessárias duas superfícies fosfolipídicas para a acomodação de uma fase aquosa e uma fase de vácuo (que representa a fase gasosa). As duas monocamadas fosfolipídicas servem para conter a fase aquosa e impedir que as moléculas de água se espalhem pela caixa (e imagens periódicas) após o acoplamento de pressão/tensão superficial (Figura 10).

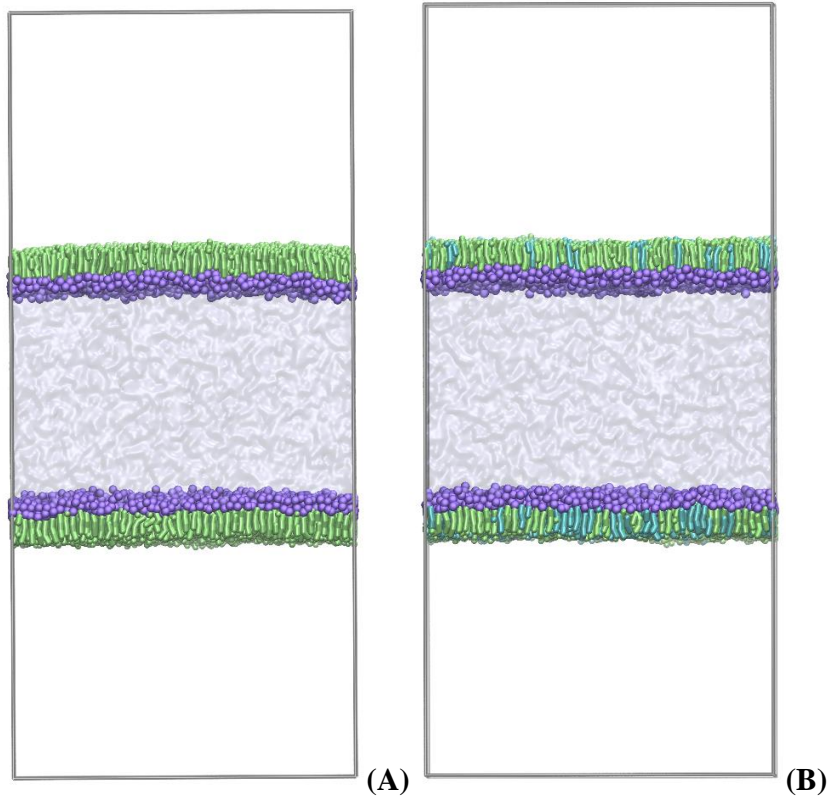


Figura 10. Modelos de surfactante pulmonar no campo de força MARTINI. **(A)** Monocamadas simétricas contendo DPPC e **(B)** uma mistura 7:3 de DPPC/DPPG. Os bastões verdes representam as cadeias hidrocarbônicas do DPPC, enquanto as azuis, do DPPG. As esferas lilás representam as cabeças polares e a fase aquosa é representada pela região cinza. A região em branco é a fase vácuo, que representa a fase gasosa. O retângulo cinza define os limites e a periodicidade do sistema.

Em todo o caso, com o barostato de tensão superficial, a pressão na direção z é redimensionada por:

$$\Delta P_{zz} = \frac{\Delta t}{\tau_p} (P_{0zz} - P_{zz}(t)) \quad (3.33)$$

$$\mu_{zz} = 1 + \kappa_{Tzz} \Delta P_{zz} \quad (3.34)$$

onde τ_p é a constante de acoplamento da pressão.

A correção na direção z é usada para a convergência de γ para o valor desejado. O redimensionamento nas direções x/y é dado por:

$$\mu_{x/y} = 1 + \frac{\Delta t}{2\tau_p} \kappa_{T,x/y} \left(\frac{n\gamma_0}{\mu_{zz}L_z} - \left(P_{zz}(t) + \Delta P_{zz} - \frac{P_{xx}(t) + P_{yy}(t)}{2} \right) \right) \quad (3.35)$$

A rigor, o barostato de tensão superficial gera um ensemble $NP_z\gamma T$, embora por questão de simplicidade, este será referido como $N\gamma T$ daqui em diante.

3.3.5. Algoritmo de restrição (LINCS)

Em alguns casos, é mais conveniente que as ligações sejam descritas por uma restrição ao invés de um oscilador harmônico (Eq. 3.4), isto é, apresentam uma distância constante durante toda a simulação. Porém, após o reescalonamento das posições, seja pelo acoplamento de pressão ou até mesmo uma minimização de energia, é necessário que as partículas restritas sejam redimensionadas para não violar a restrição. O método LINCS (LINEar Constraint Solver) consiste em uma modificação no potencial do sistema (Eq. 3.2) que não modifica sua energia total, através do uso de um multiplicador de Lagrange $k(t)$ associado a uma função de restrição g_k (HESS et al., 1997).

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = - \frac{\partial}{\partial r_i} (V(r_i(t)) - k(t)g_k) \quad (3.36)$$

$$g_i(r_i) = |r_{i1} - r_{i2}| - d_i^2 = 0 \quad i = 1, \dots, k \quad (3.37)$$

Sendo $|r_{i1} - r_{i2}|$ a distância entre os átomos restritos e d_i a distância desejada. Além do LINCS, existem outros algoritmos de restrição como o SETTLE e o SHAKE, que possuem um custo computacional maior que o LINCS

(MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992; RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977).

3.3.6. Métodos de integração

Para resolver as equações diferenciais do movimento Newtoniano (Eq. 3.1) e descrever uma trajetória dos componentes do sistema, o programa utiliza métodos numéricos de integração. O algoritmo *leap-frog* é o mais usado e consolidado (HOCKNEY; GOEL; EASTWOOD, 1974b). As posições e velocidades são atualizadas da seguinte forma:

$$\begin{cases} v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}F(t) \\ r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \end{cases} \quad (3.38)$$

O algoritmo é chamado de *leap-frog* pois as velocidades e posições são atualizadas em intervalos iguais (Δt), defasados ($\frac{1}{2}\Delta t$) e em sequência, como um jogo de “pula-sapo”. Outro algoritmo ainda mais acurado é o integrador de velocidade de Verlet (SWOPE et al., 1982).

$$\begin{cases} r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t) + \frac{\Delta t^2}{2m}F(t) \\ v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{\Delta t}{2m}[F(t) + F(t + \Delta t)] \end{cases} \quad (3.39)$$

Em resumo, cada passo temporal (Δt) de uma simulação de dinâmica molecular (utilizando o integrador *leap-frog* por exemplo) segue os seguintes passos:

1. Coletar as posições r de todos as partículas (átomos ou grãos) do sistema no tempo t e as velocidades no tempo $t - \frac{1}{2}\Delta t$;
2. Computar as forças F no tempo t sem considerar restrições (Eq. 3.2);
3. Calcular os fatores de escalonamento λ e μ_P (Caps 3.3.3 e 3.3.4) para acoplamento de temperatura e pressão respectivamente;
4. Atualizar e redimensionar as velocidades: $v' = \lambda(v + a\Delta t)$;
5. Atualizar as posições sem considerar as restrições: $r' = r + v'\Delta t$;
6. Aplicar o algoritmo de restrição: $r' \rightarrow r''$;

7. Corrigir velocidades: $v'' = \frac{(r''-r)}{\Delta t}$;
8. Redimensionar as posições e a caixa: $r''' = \mu_P r''$ e $b' = \mu_P b$.

Após cada ciclo, informações de posições, velocidades, energias, temperatura, pressão etc. são escritos em arquivos de saída.

3.4. Cálculo da energia livre de Gibbs (ΔG)

Além de produzir uma trajetória dinâmica de um sistema, a dinâmica molecular também pode ser utilizada para realizar cálculos de energia livre. No caso de um sistema com um ensemble NPT (Eq. 3.14), a energia livre de Gibbs (G) é dada por (KÄSTNER, 2011):

$$\begin{aligned}
 Q(N, V, T) &= \int e^{-\frac{E(r)}{k_b T}} d^n r \\
 Q &= Q(N, P, T) = \int Q(N, V, T) e^{-\frac{PV}{k_b T}} C dV \quad (3.40) \\
 G &= -k_b T \ln(Q)
 \end{aligned}$$

Em um ensemble canônico, a energia livre de Helmholtz (F) é dada pela mesma relação. Entretanto, a maioria dos processos físico-químicos de interesse ocorre a pressões e temperaturas constantes. Os dois principais métodos utilizados para o cálculo do ΔG são a integração termodinâmica e a amostragem guarda-chuva. Neste capítulo, apenas o último método será discutido (KÄSTNER et al., 2006).

Quando é definida uma coordenada de reação ξ que liga dois estados termodinâmicos ($G_0 \rightarrow G$), é possível escrever a função de partição ao longo de ξ :

$$Q(\xi) = \frac{\int \delta(\xi(r) - \xi) Q(r) d^n r}{\int Q(r) d^n r} \quad (3.41)$$

onde $\delta(\xi(r) - \xi)$ é a função delta de Dirac e $\int Q(r) d^n r$ é a distribuição da função de partição em seu espaço de fase r dados n graus de liberdade internos. A energia livre em função de ξ é chamada de potencial de força média (PMF). No caso deste projeto, o interesse é calcular o PMF (e em seguida o ΔG) da transposição de uma nanopartícula de siRNA da fase vácuo (representando a fase gasosa) para a fase aquosa atravessando uma monocamada fosfolipídica, como ilustrado na Figura 11.

A coordenada de reação ξ é definida como as distâncias entre o centro de massa do siRNA e o centro de massa da fase aquosa.

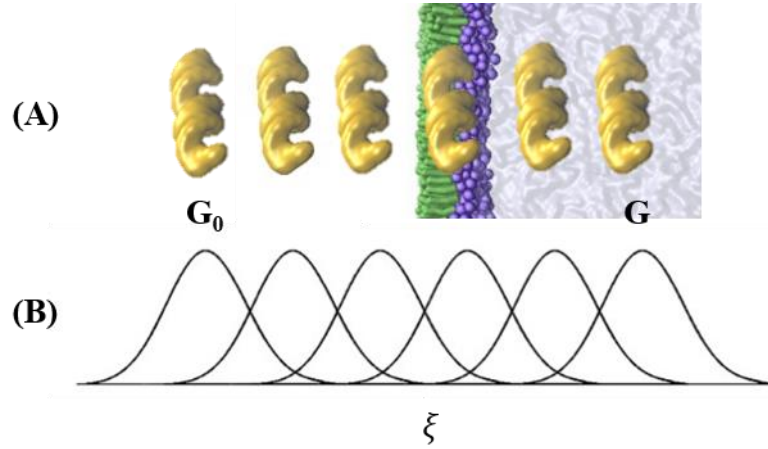


Figura 11. Coordenada de reação ξ da transposição do siRNA/nanopartículas da fase vácuo (G_0) para a fase aquosa (G). **(A)** A coordenada de reação nesse caso é definida como a distância entre o siRNA e o centro de massa da fase aquosa. **(B)** Os histogramas são as ocorrências temporais de cada janela ξ_i .

Considerando um sistema ergódico (todos os pontos do espaço de fase da função de partição são visitados eventualmente), é possível igualar a função de partição à função de distribuição temporal $P(\xi)$:

$$Q(\xi) = P(\xi) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t \rho(\xi(t')) dt' \quad (3.42)$$

onde ρ é a ocorrência de ξ em um intervalo de tempo. Numericamente, a ocorrência de um estado ξ_i (também chamado de janela) pode ser amostrada por simulações de DM.

3.4.1. Amostragem guarda-chuva

O método de amostragem guarda-chuva (do nome em inglês *Umbrella Sampling* (US)) é particularmente indicado para situações em que existem barreiras energéticas no caminho de ξ que tornam certos estados pouco populados. Ele foi desenvolvido por Torrie e Valleau em 1974 e consiste na adição de um potencial de viés $w_i(\xi)$ na energia $E^u(r)$ do sistema (TORRIE; VALLEAU, 1974, 1977a, 1977b).

$$E^b(r) = E^u(r) + w_i(\xi) \quad (3.43)$$

Aplicando (Eq. 3.43) em (Eq. 3.40) e (Eq. 3.41), para cada janela i temos uma distribuição enviesada $P_i^b(\xi)$ e uma distribuição não-enviesada $P_i^u(\xi)$ que se relacionam da seguinte forma:

$$\begin{aligned} P_i^u(\xi) &= P_i^b e^{\frac{w_i(\xi)}{k_b T}} \langle e^{-\frac{w_i(\xi)}{k_b T}} \rangle \\ \langle e^{-\frac{w_i(\xi)}{k_b T}} \rangle &= \frac{\int e^{-\frac{E^u(r)}{k_b T}} e^{\frac{w_i(\xi(r))}{k_b T}} d^n r}{\int e^{-\frac{E^u(r)}{k_b T}} d^n r} \end{aligned} \quad (3.44)$$

Aplicando (Eq. 3.40) é possível calcular $G_i(\xi)$:

$$\begin{aligned} G_i(\xi) &= -k_b T \ln(P_i^b(\xi)) - w_i(\xi) + Y_i \\ Y_i &= -\ln \langle e^{-\frac{w_i(\xi)}{k_b T}} \rangle \end{aligned} \quad (3.45)$$

A distribuição enviesada $P_i^b(\xi)$ é obtida através de simulações de DM em uma dada janela i , o termo do viés $w_i(\xi)$ é fornecido analiticamente e o último termo é uma constante em relação a ξ . Quando toda a coordenada de reação é populada é possível calcular o PMF global $G(\xi)$. O viés em geral costuma ser um potencial harmônico que assegura a amostragem em uma dada janela:

$$w_i(\xi) = \frac{K_w}{2} (\xi - \xi_i^{ref})^2 \quad (3.46)$$

Os valores de Y_i podem ser calculados utilizando o método de análise de histogramas ponderados (do nome em inglês *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM)) (KUMAR et al., 1992; SOUAILLE; ROUX, 2001). O método consiste em uma média ponderada das janelas individuais, onde o peso escolhido $p_i(\xi)$ minimiza o erro estatístico:

$$P^u(\xi) = \sum_i^{janelas} p_i(\xi) P_i^u(\xi) \quad (3.47)$$

$$\frac{\partial \sigma^2(P^u)}{\partial p_i} = 0 \quad (3.48)$$

Assumindo $\sum p_i = 1$, temos:

$$\begin{aligned} p_i &= \frac{a_i}{\sum_j a_j} \\ a_i &= n_{steps} e^{\frac{1}{k_b T} (Y_i - w_i(\xi))} \end{aligned} \quad (3.49)$$

onde n_{steps} é o número total de passos amostrados na janela i . A constante Y_i é calculada por:

$$e^{-\frac{Y_i}{k_b T}} = \int P^u(\xi) e^{-\frac{w_i}{k_b T}} d\xi \quad (3.50)$$

Como é possível notar, $P^u(\xi)$ é necessário para o cálculo de Y_i (Eq. 3.50), que por sua vez, é necessário para o cálculo de $P^u(\xi)$ (Eq. 3.47; Eq. 3.49). Por esse motivo, as equações são iteradas até atingir a convergência.

4. Metodologia

4.1. Modelos CG

Os modelos CG para lipídeos, polímeros, água (modelo não polarizável) e íons foram obtidos da base de dados do campo de força MARTINI 2.0 (Figura 12) (MARRINK et al., 2007). Os polímeros utilizados neste estudo (ver Figura 5) foram o PEG (1646 Da, 37 monômeros) e PEI (1590 Da, 36 monômeros, carga +12 em pH fisiológico). O tamanho dos polímeros foi definido a partir de trabalhos realizados anteriormente (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019). O modelo de PEI foi construído utilizando a parametrização de Beu *et al* (BEU; AILENEI; COSTINAŞ, 2020). A sequência de siRNA utilizada foi demonstrada ser um silenciador anti-TNF por Gürçan *et al.*, e suas propriedades anti-inflamatórias foram comprovadas *in vitro* (GÜRCAN et al., 2021). O programa NAFlex (HOSPITAL et al., 2013) foi utilizado para gerar a estrutura tridimensional atomística do siRNA dada a seguinte sequência: 5'-GUCUCAGCCUCUUCUCAUCCUGT-3'. O script MARTINIZE foi utilizado para o mapeamento CG da estrutura gerada e gerar um arquivo de topologia (JONG et al., 2012; MONTICELLI et al., 2008). O modelo CG do siRNA possui uma carga de -43 e é obtido utilizando o modelo elástico que é baseado em dados experimentais simulações MD atomísticas AA (DIGGINS et al., 2019; PINAMONTI et al., 2015; UUSITALO et al., 2017). O modelo elástico de siRNA não perde sua conformação helicoidal durante a simulação.

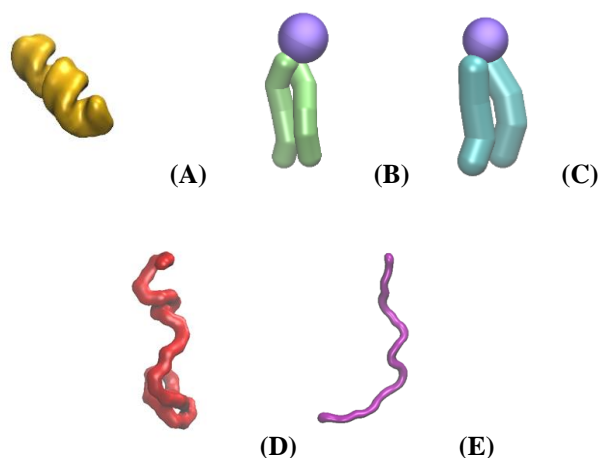


Figura 12. Modelos CG das moléculas presentes no sistema: (A) siRNA, (B) DPPC, (C) DPPG, (D) PEG, (E) PEI.

4.2. Preparação da nanopartícula

O modelo CG de siRNA foi submetido a uma minimização de energia em água em uma caixa de dimensões 10 x 10 x 10 nm³ (ver Figura 9). Esta e todas as simulações subsequentes foram realizadas utilizando o programa GROMACS (ABRAHAM et al., 2015). Os módulos *gmx_editconf* e *gmx_solvate* foram utilizados respectivamente para a criação da caixa e solvatação. O módulo *gmx_genion* foi utilizado para inserção de íons para neutralização da nanopartícula. O algoritmo de minimização de energia utilizado foi o *steepest descent*, que realizou as iterações até que a força máxima atingisse um valor menor ou igual a 100 kJ mol⁻¹ nm⁻¹. A estrutura minimizada do siRNA foi usada sozinha (Figura 13A) ou encapsulada com PEI (Figura 13B), PEG (Figura 13C), ou ambos PEI e PEG (Figura 13D). A nanopartícula B inicialmente continha 19 moléculas de PEI, C continha 50 moléculas de PEG, e D continha 17 moléculas de PEI e 17 de PEG, cada uma delas contendo uma molécula de siRNA. A “nanopartícula” A consistia apenas de uma molécula de siRNA. Uma nova simulação da NP B foi realizada com 50 moléculas de PEI. Para criar cada NP, uma caixa de dimensões 20 x 20 x 20 nm³ foi construída.

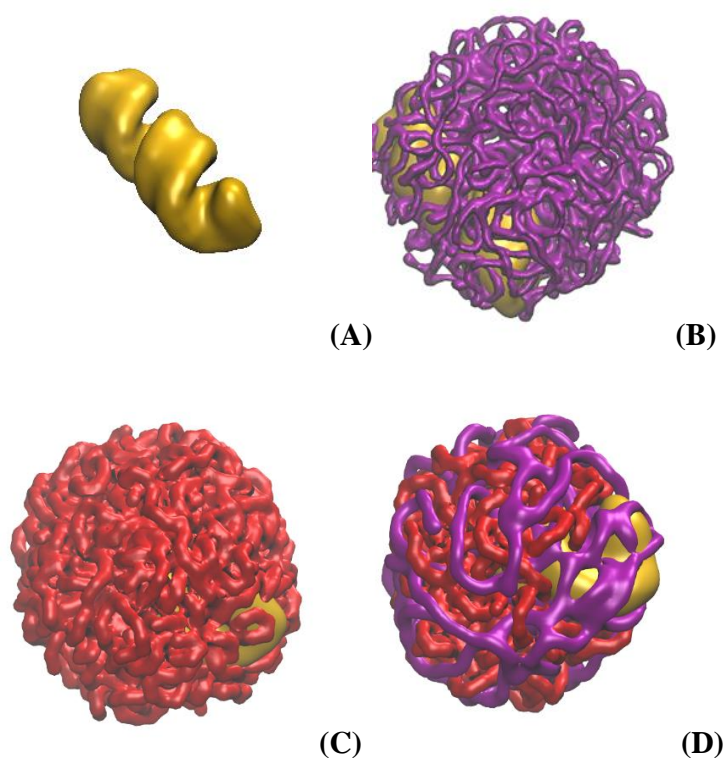


Figura 13. Nanopartículas de siRNA e polímeros PEI e PEG. (A) uma molécula de siRNA, (B) siRNA + 50 PEI, (C) siRNA + 50 PEG, (D) siRNA + 17PEI + 17 PEG.

Os módulos do GROMACS *gmx_insert-molecules* e *gmx_editconf* foram usados para criar as caixas e inserir os polímeros aleatoriamente ao redor do siRNA. Após isso, uma minimização de energia no vácuo foi executada utilizando os mesmos parâmetros mencionados acima. Depois disso, uma simulação NVT de 100 ns foi executada. Os polímeros se agregaram espontaneamente e as NP alcançaram o formato esférico mostrado na Figura 13. Vale lembrar que uma abordagem alternativa (e, em certa instância, mais realista) para o tratamento das NPs seria ligar covalentemente as cadeias poliméricas ao siRNA (JOKERST et al., 2011). Entretanto, não é do conhecimento dos autores que existam ferramentas disponíveis para construir topologias para estruturas de tamanha complexidade.

De qualquer maneira, o algoritmo utilizado para as simulações foi o *leap-frog* (HOCKNEY; GOEL; EASTWOOD, 1974a). A temperatura do sistema foi de 310 K, o termostato *v-rescale* foi utilizado (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007), e a constante de tempo (τ) foi de 1 ps. Uma NP extra (E) consistindo de 17 moléculas de PEI e 17 de PEG sem siRNA (Figura 20) também foi preparada utilizando o mesmo procedimento descrito.

Ao final, as NP possuíam um diâmetro de aproximadamente 10 nm. Para cada NP, uma simulação em água foi realizada para verificar a estabilidade. As NPs foram inseridas em uma caixa de dimensões $15 \times 15 \times 15 \text{ nm}^3$, que foi solvatada utilizando o módulo *gmx_solvate*. Uma minimização de energia foi executada utilizando os mesmos parâmetros descritos acima. Após, foram realizadas uma equilibração NVT de 50 ns e uma equilibração NPT de 100ns em seguida. Os parâmetros da equilibração NVT foram os mesmos descritos acima, exceto que desta vez, as posições das NPs foram restritas. O algoritmo *leap-frog* foi utilizado, a temperatura foi de 310 K e a pressão de referência foi de 1 bar. O termostato utilizado foi o *v-rescale* com $\tau = 1 \text{ ps}$ e o barostato foi o de Berendsen com $\tau_p = 3 \text{ ps}$.

4.3. Preparação do modelo de surfactante pulmonar

Os dois modelos de SP utilizados neste estudo consistiam de uma monocamada de DPPC (Figura 10A) e uma outra monocamada de DPPC e DPPG em uma proporção 7:3 (Figura 10B) simulando 30% de cargas negativas. É possível aumentar a complexidade dos modelos incluindo outros fosfolipídeos e proteínas do surfactante. Porém, o primeiro modelo é uma boa aproximação considerando que o DPPC é o componente majoritário do SP (SOUZA et al., 2020a). O segundo modelo é útil para avaliar o efeito das cargas negativas da transposição das NPs. Existem dois motivos principais para não adicionar as proteínas do surfactante. Em primeiro lugar, não existem modelos 3D completos e disponíveis até o presente momento. Em segundo lugar, para simular precisamente a concentração de proteínas, a monocamada precisaria ser bem maior, o que seria custoso computacionalmente. Além disso, mesmo que o sistema maior fosse simulado, as interações com as proteínas não seriam estatisticamente significativas devido à maior proporção de fosfolipídeos. A ausência de proteínas simplifica o problema e torna possível a avaliação de como as cargas afetam a transposição e o ΔG da transposição, sem que outras variáveis possam afetar o processo.

O script INSANE (WASSENAAR et al., 2015) foi usado para construir duas monocamadas simétricas e paralelas (ver Cap. 3.3.4), cada uma contendo 1060 fosfolipídeos. As monocamadas foram colocadas a 12 nm de distância uma da outra utilizando o comando `gmx_editconf`. Uma caixa de água de dimensões 25 x 25 x 12 nm³ foi inserida no centro da caixa, entre as duas monocamadas. Aproximadamente 59.000 grãos de água foram inseridos através do módulo `gmx_solvate`. As cabeças polares dos fosfolipídeos foram orientadas em direção à caixa d'água e o sistema no total possuiu as dimensões de 25 x 25 x 50 nm³, o que deixou por volta de 17 nm de vácuo (representando a fase gasosa) entre as monocamadas e os limites inferior e superior da caixa, como mostra a Figura 10. O sistema foi minimizado até a força mínima chegar a um valor menor que 100 kJ mol⁻¹ nm⁻¹, também utilizando o algoritmo *steepest-descent*.

Após a minimização, os sistemas foram equilibrados por 100 ns utilizando um ensemble NVT, uma temperatura de 310 K e o termostato *v-rescale* com $\tau = 1$ ps (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007). O barostato de Berendsen foi

utilizado com $\tau_p = 3$ ps (BERENDSEN et al., 1984), e com o valor de γ definido para 20 mN m^{-1} . A pressão na direção normal P_z foi definida para 1 bar e a compressibilidade foi definida para $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ no plano xy e 0 bar^{-1} no eixo z. Em todas as simulações foram definidas condições periódicas de contorno, mas as interações de longo alcance foram ignoradas. O raio de corte para interações de Coulomb e Lennard-Jones foi de 1,2 nm e a lista de pares era atualizada a cada 10 passos, sendo 10 fs o tamanho de cada passo.

O motivo para o uso do barostato de Berendsen é que este é o mais compatível com o acoplamento de tensão superficial apesar de não ser o mais acurado. Além disso, o uso de CG elimina vários graus de liberdade, o que por si só já reduz a acurácia da simulação, tornando dispensável o uso de algoritmos mais robustos. Pelo mesmo motivo foram ignorados os cálculos de interações de longo alcance, embora seja também possível optar por utilizá-los. É conhecido da literatura que o SP é capaz de reduzir a tensão superficial alveolar para valores de até 0 mN m^{-1} na compressão pulmonar máxima, e valores de até 20 mN m^{-1} com na expansão máxima (SAAD et al., 2012; ZASADZINSKI et al., 2001). Também se sabe que nanopartículas causam o colapso da monocamada quando sujeitas a valores de γ próximos de zero (ESTRADA-LÓPEZ et al., 2017). Dessa forma, 20 mN m^{-1} é a escolha de γ mais relevante que permite a transposição da NP através do modelo de SP sem colapso. Para demonstrar que o sistema alcançou o equilíbrio foram coletadas informações a respeito da área do sistema no plano XY ao longo dos 100 ns de equilibração (Figura 17) utilizando o módulo *gmx_energy*.

4.4. Detalhes das simulações

Após a equilibração das monocamadas, o módulo *gmx_insert-molecules* do GROMACS foi usado para inserir o siRNA ou as NPs aproximadamente a 10 nm de distância da monocamada superior, na fase vácuo. O módulo *gmx_genion* foi usado para inserir íons na fase aquosa para neutralizar as cargas. As etapas de minimização e equilibração foram executadas utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente, exceto com o uso da restrição de posição para as NPs. Após a equilibração a 310 K e 20 mN m^{-1} , 200 ns de simulações de arraste NγT foram realizadas para cada sistema utilizando um viés de força harmônico. A simulação

de arraste assegura que a NP irá percorrer atravessar o filme de SP e toda a coordenada de reação será populada (ver Figura 11). Como mencionado anteriormente, a coordenada de reação ξ é definida como a distância entre os centros de massa do siRNA e da caixa de água (mais precisamente, a componente z da distância). A constante de força do potencial harmônico K_w foi de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ e a velocidade do arraste foi mantida constante. A NP foi arrastada na direção $-z$ em direção à fase aquosa. As Figuras 14 e 15 mostram respectivamente as configurações iniciais dos sistemas de NPs com os modelos de DPPC e DPPC/DPPG. Para comprovar a necessidade do uso do arraste, foram realizadas simulações não-enviesadas em cada modelo de SP e utilizando os sistemas de siRNA, PEI/PEG e siRNA/PEI/PEG (Figuras 19-21).

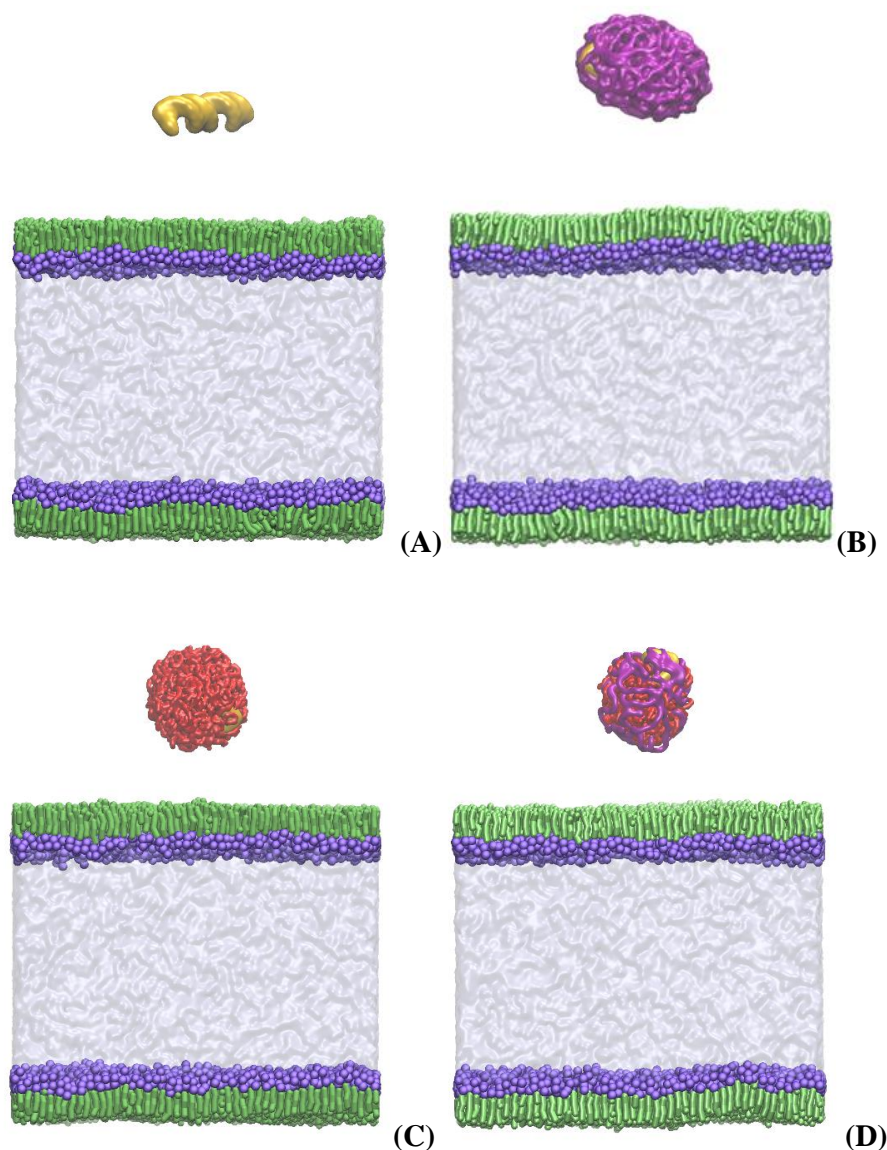


Figura 14. Configuração inicial das NPs no sistema de DPPC.

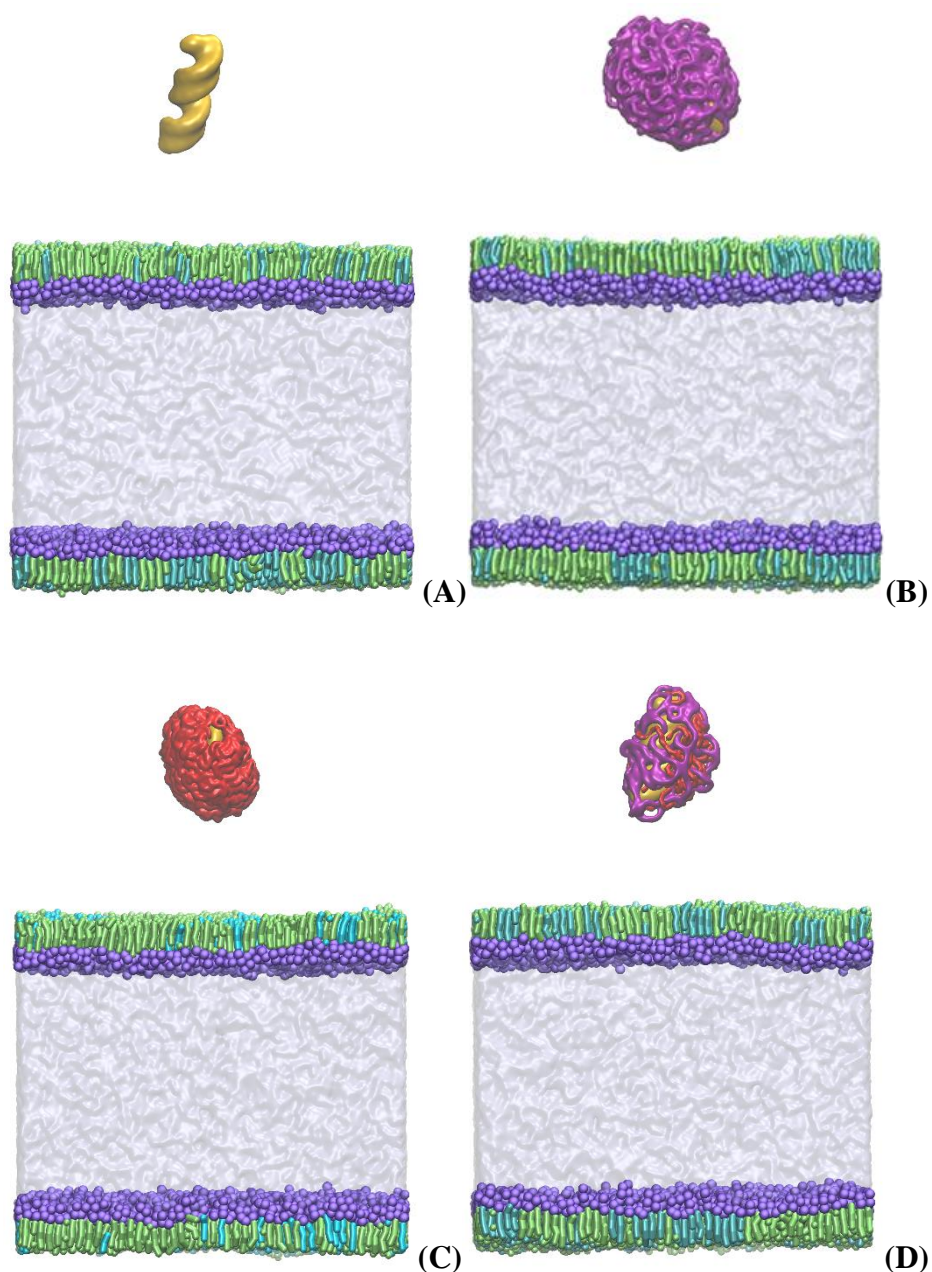


Figura 15. Configuração inicial das NPs no sistema de DPPC/DPPG.

4.5. Cálculos do ΔG

A amostragem guarda-chuva foi utilizada para calcular a energia livre de Gibbs (ΔG) da transposição da NP da fase vácuo para a fase aquosa através da membrana lipídica (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019; SOUZA et al., 2018; TORRIE; VALLEAU, 1977a, 1977b). As trajetórias enviesadas foram amostradas em um intervalo de 0,2 nm, isto é, a cada 0,2 nm de distância percorrida pelo siRNA

uma imagem do sistema foi coletada. Cada janela foi equilibrada por 50 ns utilizando um ensemble N γ T, seguido de 100 ns de simulações enviesadas N γ T. Os detalhes das simulações são os mesmos descritos acima, exceto que neste caso a nanopartícula está sujeita a um potencial harmônico que restringe sua posição a uma certa distância da caixa d'água definida pela janela (ver Figura 11). A constante de força do potencial harmônico variou entre 500 e 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻² e a energia da janela inicial foi definida para 0 kJ mol⁻¹. O método WHAM foi utilizado para computar o PMF, $G(\xi)$ (HUB; DE GROOT; VAN DER SPOEL, 2010; KUMAR et al., 1992; STELZL et al., 2017).

4.6. Outras análises

Os parâmetros de ordem (S_z), dados pela fórmula abaixo, foram calculados para avaliar a perturbação das nanopartículas na monocamada.

$$S_z = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \varphi - 1 \rangle$$

onde φ é o ângulo entre uma ligação e a direção normal (eixo z). Os parâmetros de ordem estão relacionados com a ordem geral da monocamada pois calculam a orientação média de uma ligação C–C (ou nesse caso, grãos C–C) em relação ao vetor normal. Um valor de -0,5 indica uma ligação perpendicular à normal, enquanto o valor 1 indica uma ligação paralela. Os parâmetros de ordem de fosfolipídeos em um campo de força CG não devem ser comparados diretamente com parâmetros de ordem atomísticos e nem equivalentes experimentais, mas podem ser comparados com um controle de uma simulação CG. Os últimos 50 ns das simulações (siRNA na fase aquosa) foram coletados para o cálculo dos parâmetros de ordem das quatro ligações dos grãos hidrocarbônicos de uma das cadeias do DPPC (Figura 16) utilizando o script *do-order* (JONG et al., 2012; MONTICELLI et al., 2008).

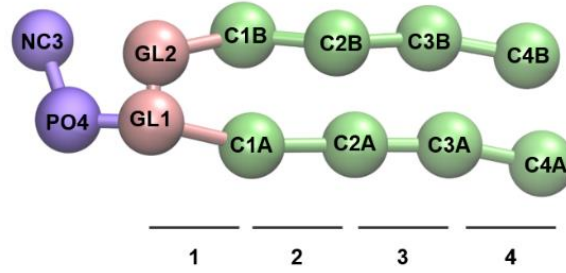


Figura 16. Estrutura e nomenclatura do DPPC no campo de força MARTINI. Os números de 1 a 4 rotulam as ligações escolhidas para o cálculo dos parâmetros de ordem.

A função de distribuição radial $g(r)$ também foi calculada para coletar informações a respeito da distribuição de fosfolipídeos ao redor do siRNA nos últimos 50 ns de simulação (siRNA na fase aquosa). O $g(r)$ é calculado pela seguinte equação:

$$g_{AB}(r_g) = \frac{\langle \rho_B(r_g) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{g,ij} - r_g)}{4\pi r^2}$$

onde $\langle \rho_B(r_g) \rangle$ é a densidade da partícula B em um casco esférico ao redor da partícula A com raio r_g , e $\langle \rho_B \rangle_{\text{local}}$ é a densidade total da partícula B dentro de uma esfera ao redor da partícula A com raio máximo, que costuma ser metade do tamanho da caixa do sistema. Para lidar com o problema de uma forma numérica, a função δ é substituída por um histograma de densidade em uma região radial calculada pelo programa *gmx_rdf*. O programa divide o sistema em cascas esféricas centradas em uma referência, que neste caso é o centro de massa do siRNA. Com o cálculo de $g(r)$ é possível demonstrar a presença de uma coroa e/ou arraste de fosfolipídeos, que produzirá uma maior densidade de DPPC no gráfico.

5. Resultados e Discussões

5.1. Resultados Preliminares

Para verificar se as etapas de equilibração inicial das monocamadas de DPPC e DPPC/DPPG (sem a transposição das nanopartículas) foram bem-sucedidas, a área do plano XY da caixa foi coletada durante os 100 ns de simulação. A Figura 17 mostra a área da caixa das monocamadas ao longo do tempo de simulação. É possível notar que as monocamadas atingem o equilíbrio antes de 100 ns. O resultado indica que 100 ns são suficientes para equilibrar a tensão superficial do sistema a 20 mN m^{-1} . É possível ver pelo gráfico que a 20 mN m^{-1} , a área por molécula é aproximadamente 45 Å^2 , em acordo com dados experimentais (DISALVO et al., 2022).

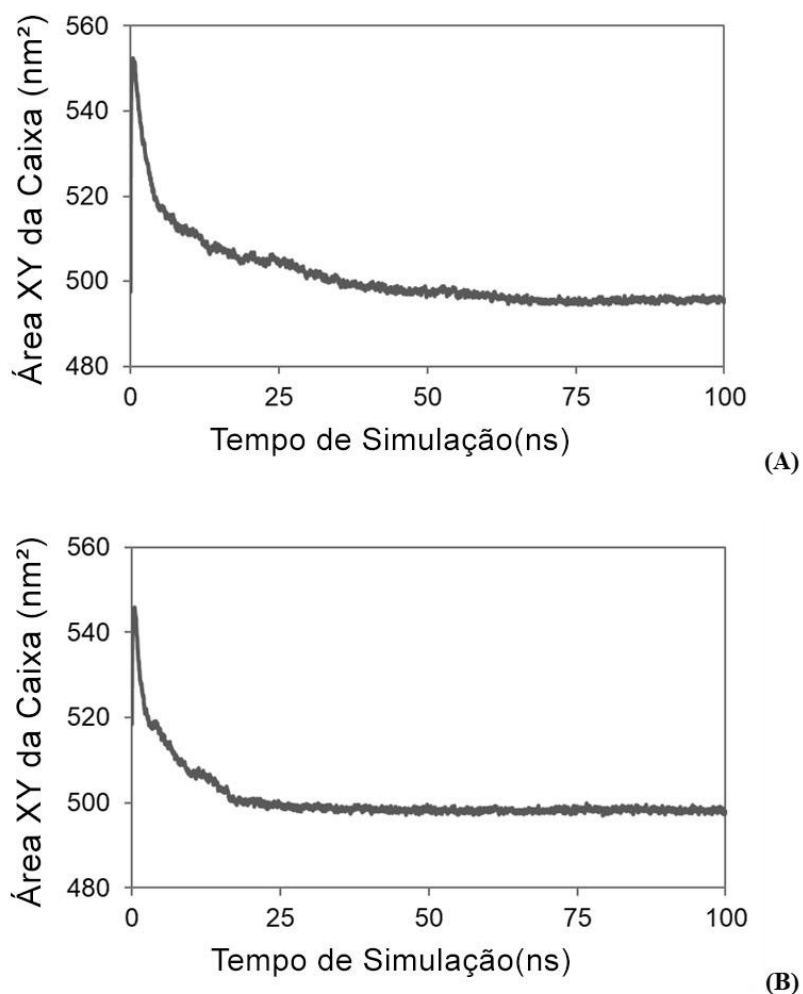


Figura 17. Evolução da área XY da caixa ao longo do tempo de simulação nas etapas de equilibração a 20 mN m^{-1} . **(A)** Monocamada de DPPC, **(B)** Monocamada de DPPC/DPPG.

As nanopartículas poliméricas foram simuladas em uma caixa de água para avaliar sua estabilidade. A Figura 18 mostra que ao final de 200 ns, os polímeros se dispersam na fase aquosa. É possível notar (Figura 18A e 18C) que as moléculas de PEI ainda interagem com o siRNA devido às interações de cargas opostas. O mesmo comportamento poderia ser evitado com a adição de ligações covalentes entre os polímeros e o siRNA (JOKERST et al., 2011), o que, como já discutido, está fora do escopo deste projeto devido a necessidade de validação de novas parametrizações. Além disso, essas ligações possuem propriedades especiais que são difíceis de serem validadas por DM com comparação do experimento, como por exemplo a sensibilidade ao pH e força iônica que podem levar a uma liberação específica e direcionada. Uma alternativa seria o uso de um modelo elástico da nanopartícula, o que asseguraria o formato esférico da nanopartícula, mas ignoraria ainda mais graus de liberdade do problema. Como o objetivo deste projeto é avaliar o comportamento das moléculas ao interagir com a monocamada segundo o campo de força MARTINI, foi optado pela construção de NPs baseadas apenas com interações de van de Waals entre os polímeros e o siRNA.

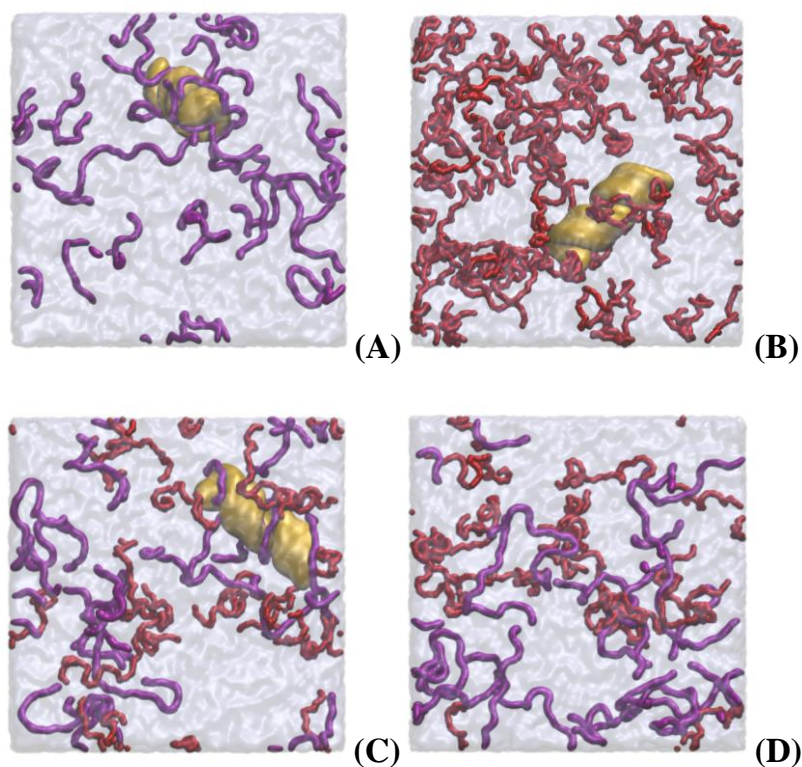


Figura 18. Configuração das nanopartículas após 200 ns em água. Os polímeros se dispersam na fase aquosa e a nanopartícula se desfaz. (A) siRNA/PEI, (B) siRNA/PEG, (C) siRNA/PEI/PEG, (D) PEI/PEG. As simulações foram realizadas a 310 K e a 1 bar.

A Figura 19 mostra as simulações não-enviesadas e sem arraste dos sistemas de siRNA sem polímeros em ambos os modelos de SP. É possível observar que em ambos os modelos de SP, uma única molécula de siRNA atravessa espontaneamente o filme e chega à fase aquosa. As simulações mostraram que o siRNA se acomoda horizontalmente nas cadeias hidrocarbônicas imediatamente após o contato com a monocamada (Figura 19A). O siRNA então espontaneamente assume uma configuração vertical e inicia sua transposição pela monocamada (Figura 19B). Em ambos os casos, após 200 ns (Figura 19C) o siRNA se encontra “preso” interagindo com as cabeças polares dos fosfolípídeos. No caso do filme de DPPC, o siRNA chega a ser liberado na fase aquosa, porém imediatamente volta a interagir com as cabeças polares (não mostrado aqui). Este resultado mostra que as simulações não-enviesadas (sem o arraste), apesar de serem capazes de mostrar um processo de transposição espontaneamente, não são apropriados para gerar configurações em todas as regiões da coordenada de reação, em especial livre na fase aquosa. Não só o siRNA não popula regiões mais próximas do centro da fase aquosa, como também o processo de transposição é rápido o suficiente para não haver configurações uniformemente distribuídas na região da interação com a monocamada.

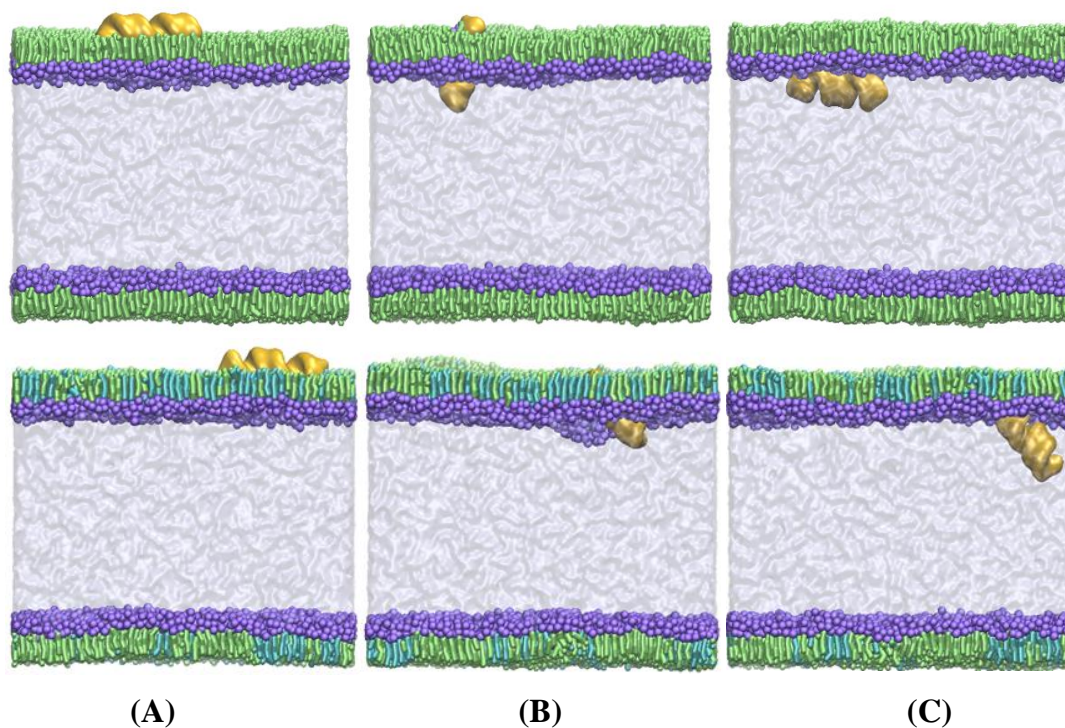


Figura 19. Simulações não-enviesadas de siRNA nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG, respectivamente. (A) Início da simulação, (B) contato do siRNA com as monocamadas e (C) Simulação após 200 ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

As Figuras 20 e 21 mostram respectivamente as simulações não enviesadas das NPS PEI/PEG e siRNA/PEI/PEG. Ambas as simulações mostram que as simulações não-enviesadas não são capazes de simular a transposição de nanopartículas maiores no filme de SP em 200 ns pois estas passam a maior parte da simulação “presas” nas cadeias hidrocarbônicas. Os resultados indicam que o uso do arraste é essencial para coletar configurações das nanopartículas em todas as regiões da coordenada de reação. Seria necessário um tempo de simulação de ~ 1 ms a 1 s, o que seria um tempo computacional inviável para estas simulações serem realizadas.

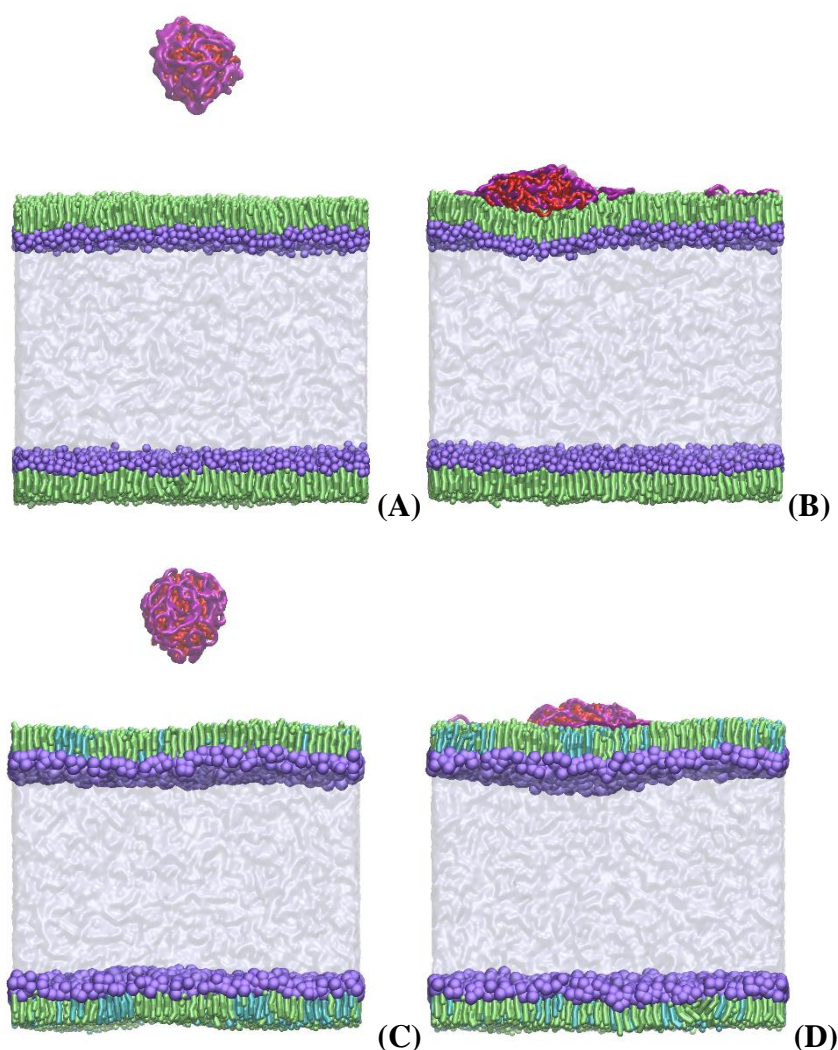


Figura 20. Simulações não-enviesadas de PEI + PEG nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG. **(A)** Início da simulação no sistema de DPPC, **(B)** Simulação após 200 ns, **(C)** Início da simulação no sistema de DPPC/DPPG, **(D)** Simulação após 200ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m^{-1} .

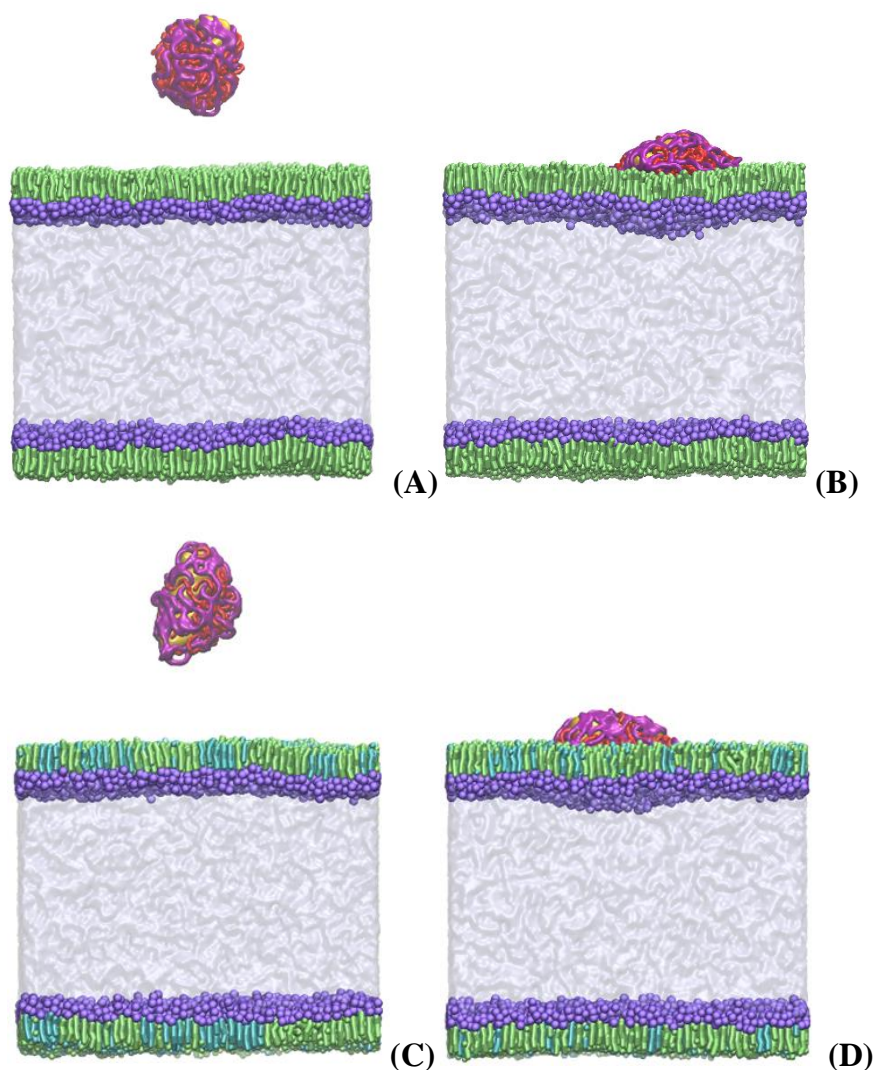


Figura 21. Simulações não-enviesadas de siRNA/PEI/PEG nos modelos de DPPC e DPPC/DPPG. (A) Início da simulação no sistema de DPPC, (B) Simulação após 200 ns, (C) Início da simulação no sistema de DPPC/DPPG, (D) Simulação após 200ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

5.2. Transposição de nanopartículas em DPPC

A Figura 22 mostra as configurações finais das simulações enviesadas após as nanopartículas serem arrastadas para a fase aquosa (200 ns). Como esperado, as NPs se desmancham devido à dispersão dos polímeros na fase aquosa. Após 200 ns, não há uma perturbação visível nas monocamadas dos sistemas de siRNA (Figura 22A) e siRNA/PEI (Figura 22B). É possível notar uma forte interação entre as moléculas de PEI e siRNA ao final da simulação devido às interações eletrostáticas de cargas opostas. Já as nanopartículas contendo PEG (siRNA/PEG e siRNA/PEI/PEG) parecem induzir a formação de agregados com fosfolipídeos. A

NP contendo apenas PEG induz a formação de um agregado contendo siRNA/DPPC/PEG (Figura 22C), enquanto a nanopartícula contendo PEI e PEG induz um agregado contendo DPPC/PEG (Figura 22D), ambos bem estáveis na fase aquosa.

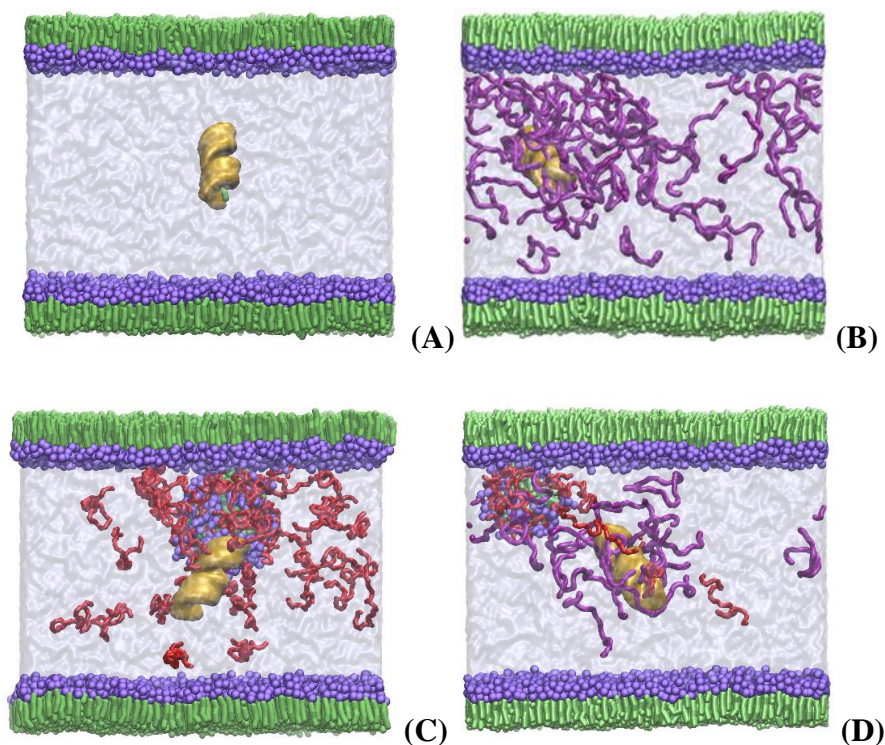


Figura 22. Configurações dos sistemas de DPPC após 200 ns. (A) siRNA, (B) siRNA/PEI, (C) siRNA/PEG, (D) siRNA/PEI/PEG. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

É importante mencionar que, durante a transposição da NP contendo siRNA/PEI ocorre o colapso da monocamada, como mostra a Figura 23. Após 200 ns, quando a NP chega à fase aquosa, os polímeros se dispersam na fase aquosa e os fosfolípidos são readsorvidos na monocamada.

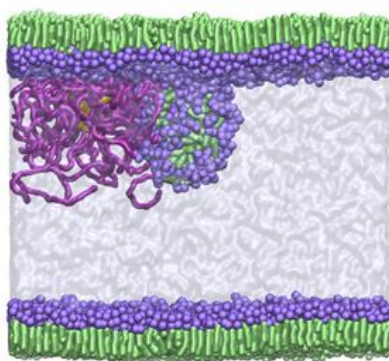


Figura 23. A transposição da NP contendo PEI induz a formação de um agregado que é readsorvido à monocamada após 200 ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

5.3. Transposição de nanopartículas em DPPC/DPPG

As simulações no modelo de DPPC/DPPG (Figura 24) mostraram um resultado similar. Novamente, o siRNA sozinho não causa perturbação visível na monocamada após 200 ns (Figura 24A). A nanopartícula de PEI causa um colapso no filme, mas dessa vez os fosfolipídeos não são readsorvidos na monocamada após 200 ns (Figura 24B). A presença do PEG (siRNA/PEI e siRNA/PEG) na NP parece causar arraste de fosfolipídeos e formação de um agregado estável. Desta vez, o siRNA interage com o agregado no sistema siRNA/PEI/PEG.

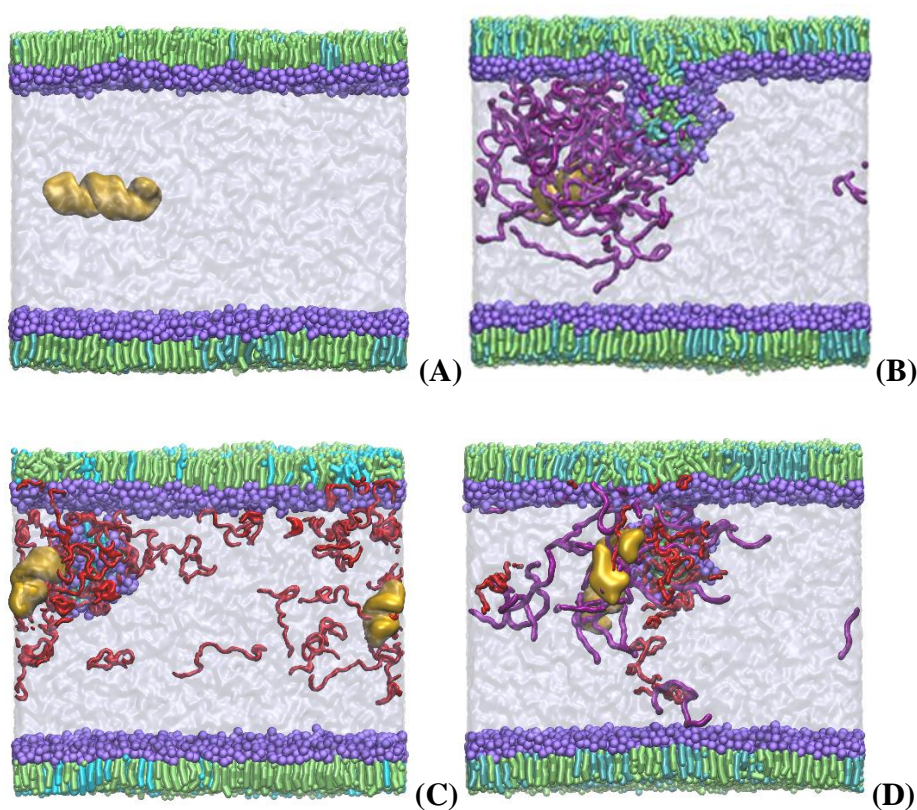


Figura 24. Configurações dos sistemas de DPPC/DPPG após 200 ns. (A) siRNA, (B) siRNA/PEI, (C) siRNA/PEG, (D) siRNA/PEI/PEG. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

5.4. Extensão de simulações

Para verificar a estabilidade dos agregados formados, as simulações em que houve formação de agregados foram estendidas por mais 200 ns sem potencial de viés e sem arraste, deixando o siRNA e polímeros livres pelo sistema. O agregado fosfolipídico gerado pela transposição da NP siRNA/PEI na monocamada de

DPPC/DPPG (ver Figura 24B) foi readsorvido durante a nova simulação (Figura 25). É possível notar uma forte interação do siRNA com moléculas de PEI devido às interações eletrostáticas de cargas opostas.

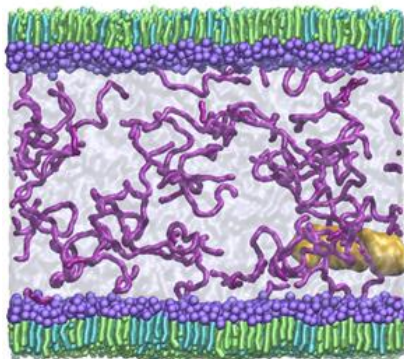


Figura 25. A transposição da NP contendo PEI induz a formação de um agregado que é readsorvido à monocamada após 200 ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m^{-1} .

Já os outros agregados contendo PEG permaneceram estáveis na fase aquosa. A Figura 26 mostra os sistemas de DPPC após mais 200 ns. É possível notar que o agregado não é adsorvido na monocamada. No sistema siRNA/PEG (Figura 26A), o siRNA permanece interagindo tanto com o agregado DPPC/PEG quanto com as cabeças polares da monocamada. Já no sistema siRNA/PEI/PEG (Figura 26B), o agregado interage com as cabeças polares da monocamada, mas não com o siRNA, que por sua vez interage com as moléculas de PEI na fase aquosa. A princípio, seria possível inferir que a presença do PEI protege o siRNA de interagir com o agregado fosfolipídico ou com a monocamada. Mas os resultados com a monocamada de DPPC/DPPG mostram resultados opostos, o que é discutido logo a seguir. A Figura 27 mostra os agregados de PEG/DPPC após os 200 ns de simulação.

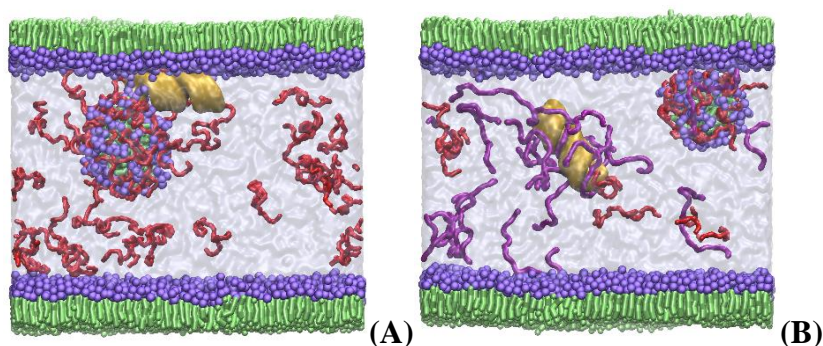


Figura 26. Extensão das simulações dos sistemas siRNA/PEG (A) e siRNA/PEI/PEG (B) nas monocamadas de DPPC por mais 200 ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m^{-1} .

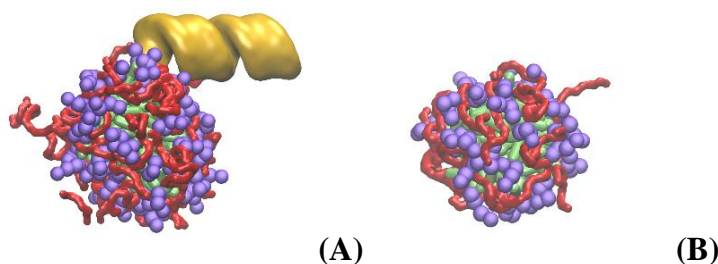


Figura 27. Agregados de DPPC e PEG nos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC. O primeiro agregado **(A)** interage com o siRNA.

As simulações das monocamadas de DPPC/DPPG também foram extendidas por mais 200 ns, sem potencial de viés e sem arraste. Os agregados de fosfolipídeos/polímero formados também permaneceram estáveis por toda a simulação, como mostra a Figura 28. No sistema siRNA/PEG (Figura 28A) o agregado permanece na fase aquosa e não interage com a monocamada nem com o siRNA, que por sua vez interage com as cabeças polares da monocamada superior. Já no sistema siRNA/PEI/PEG (Figura 28B) existe a interação entre o agregado, a monocamada e o siRNA. Também existe a interação entre o siRNA e algumas moléculas de PEI, mas que não impede a interação do siRNA com o agregado ou com a monocamada, como observado na monocamada contendo apenas DPPC. Não se deve afirmar que esta diferença se deve à presença das cargas negativas do DPPG. Com um sistema de tamanha complexidade e sem interações de longo alcance, é interessante que as simulações sejam repetidas com pequenas variações nas condições iniciais para estimar o impacto da aleatoriedade das interações. A Figura 29 mostra os agregados de PEG/DPPC após os 200 ns de simulação

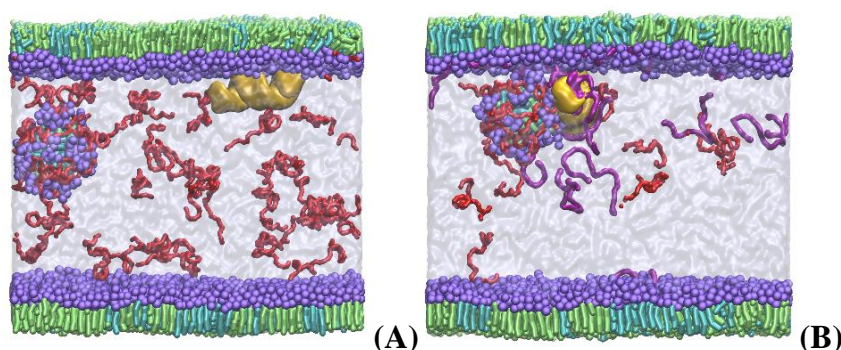


Figura 28. Extensão das simulações dos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC por mais 200 ns. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

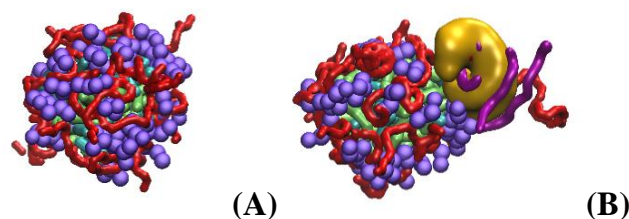


Figura 29. Agregados de DPPC e PEG nos sistemas siRNA/PEG **(A)** e siRNA/PEI/PEG **(B)** nas monocamadas de DPPC. O primeiro agregado **(A)** interage com o siRNA.

É conhecido que nanopartículas em geral apresentam uma toxicidade em potencial para os pulmões quando inaladas, especialmente devido às interações com o surfactante pulmonar, que por sua vez pode ter sua função prejudicada, o que pode levar a problemas respiratórios (GUZMÁN; SANTINI, 2019). O agregado formado pela nanopartícula e os fosfolípidos do SP é chamado de coroa e é entendido como uma peça-chave no mecanismo da toxicidade pois confere à NP propriedades físico-químicas diferentes (HU et al., 2017, 2011; LESNIAK et al., 2012; LUNOV et al., 2011; QIAO et al., 2007). Já foi demonstrado que certos fatores como hidrofobicidade, cargas, e tamanho da NP impactam diretamente na formação ou não de coroa (DAILEY et al., 2015; HU et al., 2017; SEIFFERT et al., 2015; SOUZA et al., 2020b; VALLE et al., 2014). Na literatura é possível encontrar diversas evidências (tanto experimentais quanto simulações) de que a formação de coroa está associada à toxicidade pulmonar, que pode ser causada pela remoção de fosfolípidos e proteínas do surfactante pulmonar (NISOH et al., 2015; SEIFFERT et al., 2015; VALLE; WU; ZUO, 2015). Aqui, vemos que a presença do PEG na nanopartícula causa a formação de coroas fosfolipídicas altamente estáveis em fase aquosa, o que pode produzir uma deficiência fosfolipídica do SP. É possível que a presença do PEI interrompa uma interação contínua do siRNA com o SP, facilitando sua liberação nas células pulmonares. Também foi possível observar que as moléculas de PEG não interagem com a monocamada, e sim, com a fase aquosa e as coroas. É importante mencionar que uma maior hidrofobicidade das NPs costuma estar mais relacionada com a formação de coroa (HU et al., 2017; NISOH et al., 2015; SOUZA et al., 2020b; VALLE; WU; ZUO, 2015). Esta tendência não foi observada em nossas simulações pois o polímero PEG é polar. Entretanto, o PEI, que é mais hidrofílico devido à presença de cargas, não induziu formação de coroas.

5.5. Parâmetros de ordem

A Figura 30 mostra os parâmetros de ordem calculados para as quatro ligações dos grãos que representam a cadeia hidrocarbônica do DPPC (ver Figura 16). Os valores são médias temporais dos últimos 50 ns e de todas as moléculas de DPPC do sistema. Os valores foram calculados apenas para as simulações da monocamada de DPPC. O sistema com apenas siRNA provocou poucas perturbações na monocamada (também em comparação com as monocamadas equilibradas sem NPs), e, portanto, foi escolhido como referência para o gráfico. Em amarelo, os valores de S_z para o sistema com siRNA, roxo para siRNA/PEI, vermelho para siRNA/PEG e verde para siRNA/PEI/PEG. Em primeiro lugar, é fácil ver que os valores para o sistema siRNA/PEI estão muito próximos do sistema contendo apenas siRNA. É importante mencionar que esses valores foram obtidos para a simulação de uma nanopartícula contendo apenas 19 moléculas de PEI (da fase de testes preliminares), e os valores para o sistema com 50 moléculas de PEI (Figura 22B) não foram calculados. Além disso, os valores para as monocamadas contendo DPPG também não foram calculados.

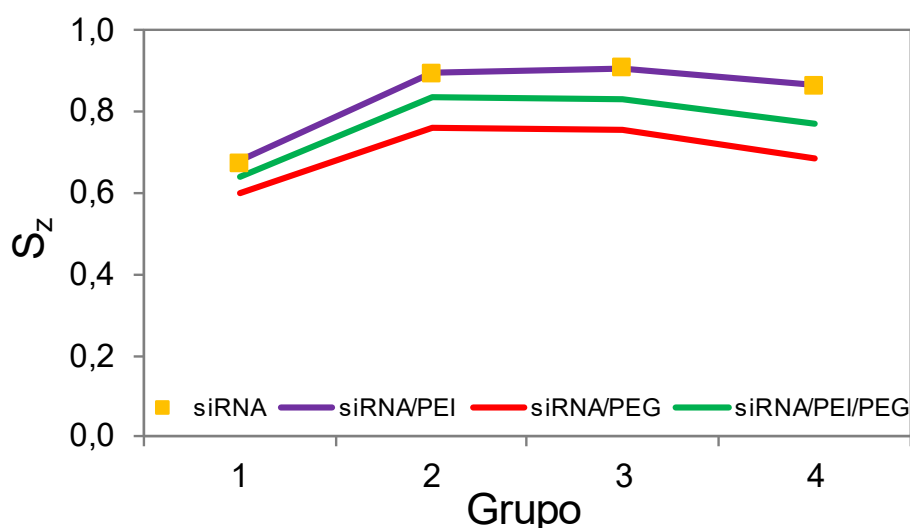


Figura 30. Parâmetros de ordem calculados para as ligações das cadeias hidrocarbônicas de DPPC nos sistemas siRNA (pontos amarelos), siRNA/PEI (curva roxa), siRNA/PEG (curva vermelha), e siRNA/PEI/PEG (curva verde). Os parâmetros de ordem para as simulações do filme de DPPC/DPPG não foram calculados. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹.

É possível notar pelo gráfico que a presença de PEG diminui os valores de S_z , o que indica perturbação da monocamada. Entretanto, a presença de PEI parece reduzir esta perturbação pois os valores para o sistema siRNA/PEG são menores que os para o sistema siRNA/PEI/PEG. Isso indica que a presença do PEI é importante para preservar a organização da monocamada, e este resultado somado ao resultado visual das simulações indica que o SP não é afetado negativamente pela presença do PEI. Entretanto, vale a pena mencionar mais uma vez que os resultados em roxo se referem a uma nanopartícula menor (siRNA + 19 moléculas de PEI) que causa menos perturbação na monocamada. Acredita-se que o resultado para a nanopartícula maior (50 moléculas de PEI) não seria muito diferente, uma vez que são coletados os últimos 50 ns de simulação, quando o breve colapso do filme (ver Figura 23) foi normalizado e não houve uma remoção de fosfolípidos.

5.6. Função de distribuição radial

A Figura 31 mostra a função de distribuição radial para todos os sistemas de monocamada de DPPC. As curvas de $g(r)$ para os sistemas siRNA (amarelo), siRNA/PEI (roxo), e siRNA/PEI/PEG (verde) possuem formatos semelhantes, sendo a curva amarela levemente deslocada. As curvas de $g(r)$ são altamente sensíveis a pequenas mudanças na trajetória. A curva para o sistema siRNA/PEG (vermelho) se destaca entre as demais, mostrando um pico antes de 2 nm que indica alta densidade de DPPC ao redor da molécula de siRNA após a transposição. Este mesmo resultado não é observado na curva do sistema siRNA/PEI/PEG (verde) pois as moléculas de DPPC estão longe o suficiente do siRNA ao ponto de não ser possível distinguir entre os fosfolípidos da camada e do agregado. Este resultado corrobora a observação visual de que o siRNA está interagindo com o agregado de DPPC/PEG após a transposição. O cálculo de $g(r)$ não foi realizado para os sistemas com monocamada de DPPC/DPPG ou para o sistema contendo 50 moléculas de PEI.

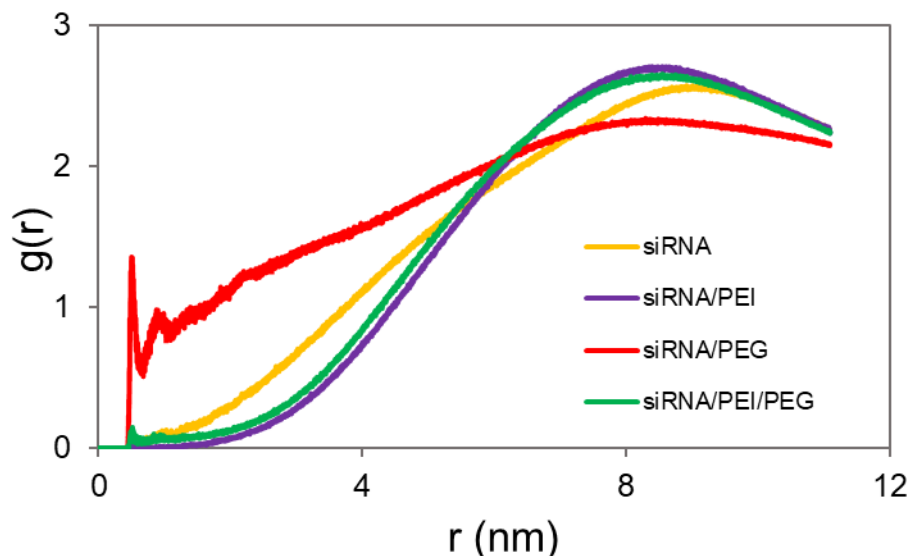


Figura 31. Curvas de função da distribuição radial ($g(r)$) de moléculas de DPPC ao redor do siRNA durante os últimos 50 ns de simulação para os sistemas siRNA (curva amarela), siRNA/PEI (curva roxa), siRNA/PEG (curva vermelha), e siRNA/PEI/PEG (curva verde). O centro de massa de cada molécula de DPPC foi utilizado para o cálculo e o siRNA foi usado como referência. As curvas para as simulações do filme de DPPC/DPPG não foram calculadas. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹

5.7. Resultados dos cálculos de ΔG

A Figura 32 mostra as curvas de PMF da transposição do siRNA na monocamada de DPPC dos sistemas siRNA (amarelo), siRNA/PEI (roxo), siRNA/PEG (vermelho), siRNA/PEI/PEG (verde). Importante lembrar que a nanopartícula siRNA/PEI deste gráfico se refere à NP inicial contendo 19 moléculas de PEI ao invés de 50. Todas as curvas possuem o mesmo formato, o que indica que o siRNA possui o mesmo comportamento durante a transposição: A energia livre se mantém constante durante a fase vácuo; a energia decresce logo após o contato entre siRNA e monocamada ($\xi = -14$ nm); Após um mínimo de energia local, o siRNA supera uma pequena barreira energética ($\xi = -9$ nm) ao se liberar das cabeças polares. Enquanto o siRNA se desprende da monocamada, a energia diminui até permanecer constante após uma certa distância ($\xi = -7$ nm). É possível notar uma pequena diferença nas curvas amarela e roxa (siRNA e siRNA/PEI) que parecem ser devido à pouca cobertura, o que abre espaço para uma maior liberdade de conformações no momento da acomodação do siRNA no filme. Nesses dois casos, foi possível notar que o siRNA entrou em contato com a monocamada em uma posição perpendicular (não exibido). A Figura 33 mostra uma comparação das

curvas de PMF para o sistema siRNA/PEI/PEG na monocamada de DPPC (verde escuro) e DPPC/DPPG (verde claro). Como esperado, é possível ver que não houve uma mudança significativa, exceto em um aumento de energia no mínimo local ($\xi = -10$ nm) que culmina em uma menor barreira energética. A tabela 1 mostra os valores de ΔG para os sistemas cujos valores de ΔG puderam ser calculados.

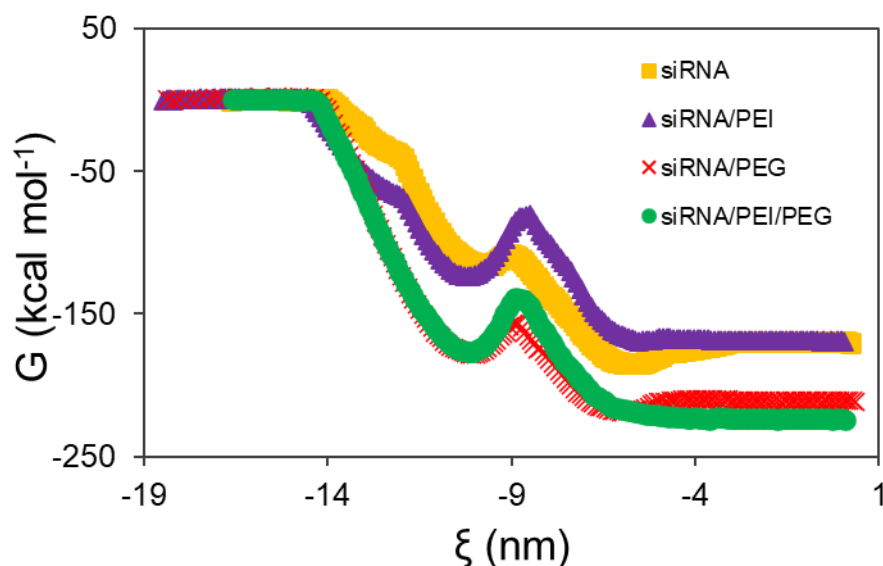


Figura 32. Perfis de potencial de força média (PMF) da transposição das NPs siRNA (curva amarela), siRNA/PEI (curva roxa), siRNA/PEG (curva vermelha) e siRNA/PEI/PEG (curva verde) em um filme de DPPC. A coordenada de reação representa a distância entre o siRNA e o centro de massa da caixa de água. Os valores negativos representam uma direção arbitrária que permite uma leitura das curvas da direita para a esquerda, na direção do processo vácuo \rightarrow água. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹

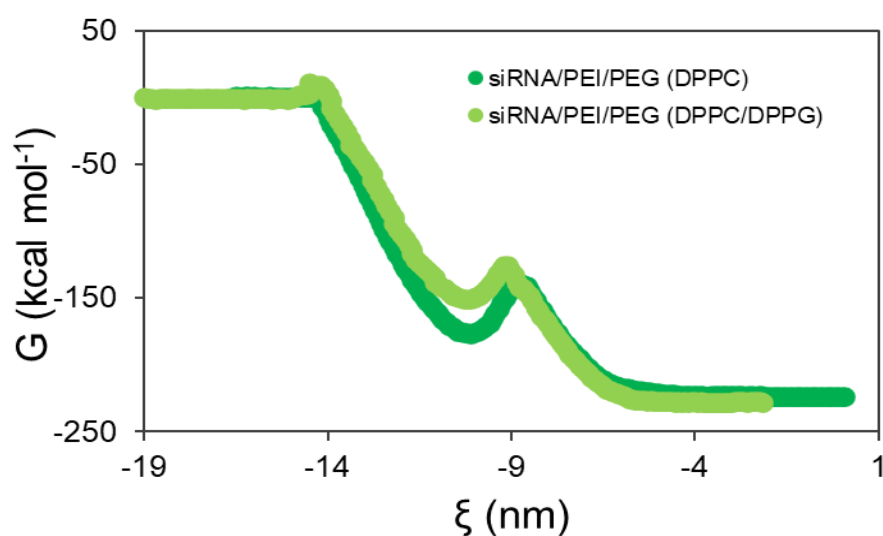


Figura 33. Comparação das curvas de PMF da transposição da NP siRNA/PEI/PEG nas monocamadas de DPPC (verde escuro) e DPPC/DPPG (verde claro). Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹

| | ΔG (kcal mol ⁻¹) | |
|----------------|--------------------------------------|------------|
| | DPPC | DPPC/DPPG |
| siRNA | -169,7±0,2 | - |
| siRNA/PEI (19) | -169,2±0,3 | - |
| siRNA/PEI (50) | - | - |
| siRNA/PEG | -211,1±0,7 | - |
| siRNA/PEI/PEG | -224,0±0,3 | -227,5±0,5 |
| PEI/PEG | - | - |

Tabela 1. Valor de ΔG calculado pela subtração dos valores das médias das energias na fase aquosa e vácuo. A barra de erro foi calculada considerando o desvio padrão de todos os valores das energias na fase aquosa e vácuo. Simulações realizadas a 310 K e 20 mN m⁻¹

É possível observar, tanto pelo gráfico da Figura 32 quanto pela Tabela 1, que a presença do PEI não parece alterar o valor de ΔG em relação às NPs correspondentes. As curvas contendo PEI parecem aumentar ligeiramente o máximo da barreira energética em $\xi = -9$ nm, o que indica uma maior resistência do siRNA em se libertar das cabeças polares. Já a presença do PEG parece diminuir o valor de ΔG da transposição (Figura 32, Tabela 1). Vale lembrar que o valor aqui calculado se refere ao ΔG global da reação global, isto é, a diferença entre as energias livres na fase aquosa e na fase vácuo. Valores menores (mais negativos) de ΔG indicam uma maior espontaneidade do processo. Os valores indicam que a transposição de NPs contendo PEG é mais espontânea do que a do siRNA sozinho, apesar de esta última superar uma barreira energética menor na região das cabeças polares ($\xi = -9$ nm).

5.8. Implicações e Perspectivas

A formação de coroa indica que as nanopartículas de siRNA encapsuladas com PEG podem causar um desconforto respiratório devido à remoção de fosfolípidos do surfactante pulmonar. Entretanto, o PEG ainda é um bom carreador e melhorador da transposição por sua capacidade de diminuir a energia livre de Gibbs do processo. Este resultado leva a crer que a nanopartícula siRNA/PEI/PEG é a melhor opção para carrear o siRNA através do SP e melhorar sua transfecção.

Utilizando ensaios de fluorescência, Merkel et al. observou que poliplexos contendo PEI eram mais estáveis após interagirem com o SP, o que indica que a presença do PEI impede a liberação do siRNA antes que o poliplexo atinja o alvo

(MERKEL et al., 2009). É possível observar (Figuras 22B, 22D, 24D, 25, 26B, 28B) que algumas moléculas de PEI ainda interagem com o siRNA ao final das simulações devido às interações eletrostáticas, enquanto a maior parte das moléculas de PEG ficam dispersas na fase aquosa ou interagem com o agregado formado. Nosso grupo já havia observado resultados semelhantes onde o PEG se dispersava na fase aquosa e também reduzia o ΔG de transposição em modelos de surfactante pulmonar (SOUZA; SOUZA; PIMENTEL, 2019). Desta vez, entretanto, não foi observada a formação de coroa fosfolipídica, provavelmente devido ao tamanho menor das nanopartículas. Esta observação está de acordo com as propriedades do PEG de melhorar a solubilidade de nanopartículas em água (BHADRA et al., 2002; QIU et al., 2021).

As cargas positivas do PEI são cruciais para a transfecção do siRNA devido ao efeito de esponja de prótons, que causa inchaço osmótico e quebra dos lisossomos (AIGNER, 2007; BEHR, 1997). De Backer *et al.* mostrou que o surfactante pulmonar reduz a capacidade de transfecção de nanogéis de dextrano carregados com siRNA, mas ainda mantendo o potencial silenciador, que é provavelmente devido a uma melhor ação do siRNA nos pulmões em relação ao sistema circulatório (DE BACKER et al., 2013; MERKEL et al., 2009; MERKEL; KISSEL, 2012). Em outro artigo, De Backer et al. descreve a ação de uma NP coberta com SP e como esta cobertura pode prevenir a toxicidade pulmonar (DE BACKER et al., 2015b). Beck-Broichsitter *et al.* descrevem como nanopartículas poliméricas podem ser tóxicas para o pulmão devido a remoção de fosfolípeos e proteínas do surfactante e mostram como esta toxicidade é reduzida quando os polímeros são ligados a um grupo fosforilcolina (BECK-BROICHSITTER; BOHR, 2019; BECK-BROICHSITTER; BOHR; RUGE, 2017).

No presente trabalho, as simulações elucidam o mecanismo de toxicidade pulmonar de nanopartículas, que pode ser explicado pela remoção de fosfolípeos e formação de coroa. Futuramente, pretende-se realizar os cálculos de ΔG e as análises para os filmes de DPPC/DPPG que ficaram em falta, além de simular outras nanopartículas com diferentes composições.

6. Conclusão

A interação de nanopartículas de siRNA e polímeros (PEG e PEI) com dois modelos de surfactante pulmonar (DPPC e DPPC/DPPG) foi investigada utilizando dinâmica molecular com um campo de força *coarse-grained* (MIGUEL PEREIRA SOUZA et al., 2022). Simulações de arraste da NP no filme de DPPC mostrou que a presença do PEG promove a formação de coroas lipídicas, apesar de diminuir o ΔG da transposição. A presença do PEI não afeta o ΔG , mas também não induz a formação de coroas, além de ser essencial para a transfecção do siRNA. As simulações mostraram que as moléculas de PEI interagem fortemente com o siRNA mesmo depois 200 ns na fase aquosa, e que os agregados lipídicos causados pelo PEG são estáveis em fase aquosa mesmo após 200 ns. Os parâmetros de ordem mostraram que o PEG causa um maior impacto na ordem da monocamada devido à remoção de fosfolipídeos. Os mesmos resultados foram observados para a monocamada de DPPC/DPPG com poucas variações. A comparação entre os valores ΔG de transposição da NP siRNA/PEI/PEG para as duas monocamadas mostra que as cargas negativas no modelo de SP diminuem a barreira energética associada à libertação da NP das cabeças polares. Unindo nossos resultados com dados da literatura, as simulações podem elucidar o mecanismo de toxicidade pulmonar de nanopartículas poliméricas que ocorre devido à formação de coroas. Outras simulações com NPs cobertas por fosfolipídeos e com diferentes polímeros podem ser úteis para corroborar mais dados da literatura.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2015.
- ABRAHAM, M. et al. **GROMACS 2024.2 Manual**. [s.l.] Zenodo, 2024.
- ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ADAMS, D. et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 1, 2018.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589–1615, 1 maio 2006.
- ADEGBOLA, S. O. et al. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.
- AIGNER, A. **Applications of RNA interference: Current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007.
- ALESSANDRI, R. et al. Pitfalls of the Martini Model. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 10, p. 5448–5460, 2019.
- ALSHAER, W. et al. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. **European Journal of Pharmacology**, v. 905, p. 174178, ago. 2021.
- AMERICAN LUNG ASSOCIATION. **Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) - Learn About ARDS**. Disponível em: <<https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/ards/learn-about-ards>>. Acesso em: 13 maio. 2024.

BAER, B. et al. New insights into exogenous surfactant as a carrier of pulmonary therapeutics. **Biochemical Pharmacology**, v. 164, p. 64–73, 2019.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 2008.

BASCONI, J. E.; SHIRTS, M. R. Effects of Temperature Control Algorithms on Transport Properties and Kinetics in Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 2887–2899, 9 jul. 2013.

BASTOS, L. DA C. et al. Investigating the selectivity of potential new inhibitors of dihydrofolate reductase from *Yersinia pestis* designed by molecular modeling. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 5, p. 1170–1176, 2019.

BECK-BROICHSITTER, M.; BOHR, A. Bioinspired polymer nanoparticles omit biophysical interactions with natural lung surfactant. **Nanotoxicology**, v. 13, n. 7, p. 964–976, 9 ago. 2019.

BECK-BROICHSITTER, M.; BOHR, A.; RUGE, C. A. Poloxamer-Decorated Polymer Nanoparticles for Lung Surfactant Compatibility. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3464–3472, 2 out. 2017.

BEHR, J. P. **The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit.** *Chimia. Anais...* 1997.

BEREAU, T.; KREMER, K. Automated Parametrization of the Coarse-Grained Martini Force Field for Small Organic Molecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 6, p. 2783–2791, 9 jun. 2015.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

- BERENDSEN, H. J. C. Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath. Em: **Computer Simulation in Materials Science**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 139–155.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BERNETTI, M.; BUSSI, G. Pressure control using stochastic cell rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 11, 21 set. 2020.
- BERNHARD, W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 208, p. 146–150, nov. 2016.
- BEU, T. A.; AILENEI, A.; COSTINAȘ, R. Martini Force Field for Protonated Polyethyleneimine. **Journal of Computational Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 349–361, 5 fev. 2020.
- BHADRA, D. et al. **Pegnology: A review of PEG-ylated systems. Pharmazie**, 2002.
- BINDER, K. et al. Molecular dynamics simulations. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, n. 5, p. S429–S453, 11 fev. 2004.
- BOFINGER, R. et al. Drug delivery, biodistribution and anti-EGFR activity: Theragnostic nanoparticles for simultaneous in vivo delivery of tyrosine kinase inhibitors and kinase activity biosensors. **Nanoscale**, v. 13, n. 44, p. 18520–18535, 2021.
- BOHR, A. et al. Anti-Inflammatory Effect of Anti-TNF- α SiRNA Cationic Phosphorus Dendrimer Nanocomplexes Administered Intranasally in a Murine Acute Lung Injury Model. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 2379–2388, 2017.
- BONO, N. et al. In silico prediction of the in vitro behavior of polymeric gene delivery vectors. **Nanoscale**, v. 13, n. 17, p. 8333–8342, 2021.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 7 jan. 2007.

BYRD, R. H. et al. A Limited Memory Algorithm for Bound Constrained Optimization. **SIAM Journal on Scientific Computing**, v. 16, n. 5, p. 1190–1208, set. 1995.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, set. 1975.

COATES, L. C. et al. Anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: Insights for the clinician. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 2, n. 1, p. 37–43, 2010.

COELHO, T. et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 819–829, 2013.

COPERCHINI, F. et al. The Cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2020.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons Ltd., 2004.

DAILEY, L. A. et al. Adenosine monophosphate is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of mice with acute respiratory toxicity induced by nanoparticles with high surface hydrophobicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 1, 2015.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.

DE BACKER, L. et al. The influence of natural pulmonary surfactant on the efficacy of siRNA-loaded dextran nanogels. **Nanomedicine**, v. 8, n. 10, p. 1625–1638, 2013.

DE BACKER, L. et al. Bio-inspired materials in drug delivery: Exploring the role of pulmonary surfactant in siRNA inhalation therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 642–650, 2015a.

DE BACKER, L. et al. Hybrid pulmonary surfactant-coated nanogels mediate efficient in vivo delivery of siRNA to murine alveolar macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 217, p. 53–63, 2015b.

DEL VALLE, D. M. et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020.

DIAZ, I. L. et al. Development of poly(ethyleneimine) grafted amphiphilic copolymers: Evaluation of their cytotoxicity and ability to complex DNA. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 36, n. 6, p. 447–463, 28 nov. 2021.

DIEZ-PINA, J. M. et al. Tumor necrosis factor alpha as a marker of systemic and local inflammation in “healthy” smokers. **International Journal of General Medicine**, p. 9, fev. 2009.

DIGGINS, P. et al. Optimal Coarse-Grained Site Selection in Elastic Network Models of Biomolecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 1, 2019.

DISALVO, E. A. et al. A Molecular View of the Surface Pressure/Area Per Lipid Isotherms Assessed by FTIR/ATR Spectroscopy. **Colloids and Interfaces**, v. 6, n. 4, p. 54, 11 out. 2022.

DZIURA, M. et al. Simulated Breathing: Application of Molecular Dynamics Simulations to Pulmonary Lung Surfactant. **Symmetry**, v. 13, n. 7, p. 1259, 14 jul. 2021.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 15 nov. 1995.

ESTRADA-LÓPEZ, E. D. et al. Prednisolone adsorption on lung surfactant models: Insights on the formation of nanoaggregates, monolayer collapse and prednisolone spreading. **RSC Advances**, v. 7, n. 9, p. 5272–5281, 2017.

FAKHR, E.; ZARE, F.; TEIMOORI-TOOLABI, L. **Precise and efficient siRNA design: A key point in competent gene silencing. Cancer Gene Therapy**, 2016.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome - Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**, v. 319, n. 7, p. 698, 20 fev. 2018.

FANELLI, V.; RANIERI, V. M. Mechanisms and Clinical Consequences of Acute Lung Injury. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. Supplement 1, p. S3–S8, mar. 2015.

FARRUGIA, M.; BARON, B. The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 2, n. 3, p. 84–90, 2016.

FATTAL, E.; BARRATT, G. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 179–194, 2009.

FELDMANN, D. P.; MERKEL, O. M. **The advantages of pulmonary delivery of therapeutic siRNA. Therapeutic Delivery**, 2015.

FELDMANN, M. et al. **Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. The Lancet**, 2020.

FORNASIER, F. et al. Lipophilicity of Coarse-Grained Cholesterol Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, p. 569–577, 2020.

FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES. The Global Impact of Respiratory Disease - Third Edition. **European Respiratory Society**, 22 set. 2021.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5577, nov. 2012.

GHARAIBEH, L. et al. Fabrication of aptamer-guided siRNA loaded lipopolyplexes for gene silencing of notch 1 in MDA-mb-231 triple negative breast cancer cell line. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, 2021.

GIANFRANCESCO, M. et al. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: Data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 79, n. 7, p. 859–866, 2020.

GLOBAL ASTHMA NETWORK. **Global Asthma Report 2022**. Disponível em: <<http://globalasthmareport.org/burden/gan.php>>. Acesso em: 12 maio. 2024.

GRANT, M. C. et al. The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. **PLOS ONE**, v. 15, n. 6, p. e0234765, 23 jun. 2020.

GRUNEWALD, F. et al. Transferable MARTINI Model of Poly(ethylene Oxide). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 29, p. 7436–7449, 2018.

GUAGLIARDO, R. et al. Surfactant protein b promotes cytosolic sirna delivery by adopting a virus-like mechanism of action. **ACS Nano**, v. 15, n. 5, p. 8095–8109, 2021.

GÜRCAN, S. et al. Combining dexamethasone and TNF- α siRNA within the same nanoparticles to enhance anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 598, 2021.

GUZMÁN, E.; SANTINI, E. Lung surfactant-particles at fluid interfaces for toxicity assessments. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 2019.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 2, p. 190–196, abr. 2002.

HESS, B. et al. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148–158, 1974a.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148–158, fev. 1974b.

HONG ZHANG, QIHUI FAN, YI E. WANG, CHARLES R. NEAL, Y. Y. Z. Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. **Biochim Biophys Acta**, v. 72, p. 2964–2979, 2018.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1 mar. 1985.

HOSPITAL, A. et al. NAFlex: a web server for the study of nucleic acid flexibility. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W47–W55, 2013.

HU, Q. et al. Unveiling the Molecular Structure of Pulmonary Surfactant Corona on Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 11, n. 7, p. 6832–6842, 2017.

HU, W. et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. **ACS Nano**, v. 5, n. 5, p. 3693–3700, 2011.

HUB, J. S.; DE GROOT, B. L.; VAN DER SPOEL, D. G-whams-a free Weighted Histogram Analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 12, 2010.

JARVIS, B.; FAULDS, D. Ethanercept: A review of its use in rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 57, p. 945–966, 1999.

JAVANAINEN, M.; MARTINEZ-SEARA, H.; VATTULAINEN, I. Excessive aggregation of membrane proteins in the Martini model. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187936, 13 nov. 2017.

JENSEN, D. M. K. et al. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 1, p. 138–145, 2010.

JOKERST, J. V et al. Nanoparticle PEGylation for Imaging and Therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 715–728, 30 jun. 2011.

JONG, D. H. DE et al. Improved parameters for the Martini coarse-grained protein force field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, p. 687–697, 2012.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 13 nov. 1996.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1 mar. 1988.

KACZMAREK, J. C.; KOWALSKI, P. S.; ANDERSON, D. G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. **Genome Medicine**, v. 9, n. 60, 2017.

KAMENIK, A. S. et al. Polarizable and non-polarizable force fields: Protein folding, unfolding, and misfolding. **The Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 18, 14 nov. 2020.

KAMINSKI, G. et al. Free Energies of Hydration and Pure Liquid Properties of Hydrocarbons from the OPLS All-Atom Model. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 49, p. 13077–13082, 1 dez. 1994.

KAMINSKI, G.; JORGENSEN, W. L. Performance of the AMBER94, MMFF94, and OPLS-AA Force Fields for Modeling Organic Liquids. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 46, p. 18010–18013, 1 jan. 1996.

KÄSTNER, J. et al. QM/MM Free-Energy Perturbation Compared to Thermodynamic Integration and Umbrella Sampling: Application to an Enzymatic Reaction. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 2, n. 2, p. 452–461, 1 mar. 2006.

KÄSTNER, J. Umbrella sampling. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 1, n. 6, p. 932–942, 26 nov. 2011.

KIM, S. Y. et al. Optimization and physicochemical characterization of a cationic lipid-phosphatidylcholine mixed emulsion formulated as a highly efficient vehicle that facilitates adenoviral gene transfer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7323–7335, 2017.

KNUDSEN, L.; OCHS, M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 150, n. 6, p. 661–676, 2 dez. 2018.

KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011–1021, 1992.

LAGANÀ, A. et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1269, p. 393–412, 2015.

LAM, J. K. W.; LIANG, W.; CHAN, H. K. **Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. Advanced Drug Delivery Reviews**, jan. 2012.

LAVERY, A. M. et al. Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients Discharged and Experiencing Same-Hospital Readmission — United States, March–August 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 45, p. 1695–1699, 13 nov. 2020.

LEDFORD, H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. **Nature**, v. 560, p. 291–292, 2018.

LEE, I. T.; YANG, C. M. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. **Mediators of Inflammation**, 2013.

LEITE NASCIMENTO, T. et al. Hyaluronic acid-conjugated lipoplexes for targeted delivery of siRNA in a murine metastatic lung cancer model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, p. 103–111, 2016.

LESNIAK, A. et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5847–5857, 2012.

LI, X. et al. Trends and risk factors of mortality and disability adjusted life years for chronic respiratory diseases from 1990 to 2017: systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **BMJ**, v. 368, p. m234, 19 fev. 2020.

LO, C. A. et al. Martini Coarse-Grained Force Field: Extension to Carbohydrates. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 12, p. 3195–3210, 2009.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487–501, 2001.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, dez. 2012.

LU, Y. et al. The mechanism for siRNA transmembrane assisted by PMAL. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

LUNOV, O. et al. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. **ACS Nano**, v. 5, n. 3, p. 1657–1669, 2011.

MARKHAM, A.; LAMB, H. M. Infliximab: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 59, p. 1341–1359, 2000.

MARRINK, S. J. et al. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812–7824, 2007.

MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 18, 14 mar. 2019.

MCDONALD, N. A.; JORGENSEN, W. L. Development of an All-Atom Force Field for Heterocycles. Properties of Liquid Pyrrole, Furan, Diazoles, and Oxazoles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 41, p. 8049–8059, 1 out. 1998.

MENDONÇA, L. S.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; SIMÕES, S. Targeted lipid-based systems for siRNA delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 65–73, 2012.

MERCKX, P. et al. Lyophilization and nebulization of pulmonary surfactant-coated nanogels for siRNA inhalation therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 157, p. 191–199, 2020.

MERKEL, O. M. et al. Nonviral siRNA delivery to the lung: Investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 4, p. 1246–1260, 2009.

MERKEL, O. M.; KISSEL, T. Nonviral pulmonary delivery of siRNA. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 7, 2012.

MIGUEL PEREIRA SOUZA, L. et al. Transposition of polymer-encapsulated small interfering RNA through lung surfactant models at the air-water interface. **Chemical Physics**, v. 563, 2022.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 7 out. 1992.

MONTICELLI, L. et al. The MARTINI coarse-grained force field: Extension to proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 5, p. 819–834, 2008.

MOUSAZADEH, H.; BONABI, E.; ZARGHAMI, N. Stimulus-responsive drug/gene delivery system based on polyethylenimine cyclodextrin nanoparticles for potential cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 276, 2022.

MUQUIER, M. et al. Synthesis of PEGylated cationic curdlan derivatives with enhanced biocompatibility. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 33, n. 4, 2022.

NASCIMENTO, D. M. et al. How lignin sticks to cellulose—insights from atomic force microscopy enhanced by machine-learning analysis and molecular dynamics simulations. **Nanoscale**, v. 14, n. 47, p. 17561–17570, 2022.

NASCIMENTO, T. L.; HILLAIEREAU, H.; FATTAL, E. Nanoscale particles for lung delivery of siRNA. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 99–108, 2012.

NISOH, N. et al. Lipid monolayer disruption caused by aggregated carbon nanoparticles. **RSC Advances**, v. 5, n. 15, p. 11676–11685, 2015.

NKADI, P. O.; MERRITT, T. A.; PILLERS, D.-A. M. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: Genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 97, n. 2, p. 95–101, jun. 2009.

NORTHWAY, W. H.; ROSAN, R. C.; PORTER, D. Y. Pulmonary Disease Following Respirator Therapy of Hyaline-Membrane Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 276, n. 7, p. 357–368, 16 fev. 1967.

NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, n. 2, p. 255–268, 10 jun. 1984.

NOSÉ, S.; KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. **Molecular Physics**, v. 50, n. 5, p. 1055–1076, 10 dez. 1983.

OE, Y. et al. Plasma TNF- α Is Associated with Inflammation and Nutrition Status in Community-Dwelling Japanese Elderly. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 61, n. 3, p. 263–269, 2015.

OLIVEIRA, A. C. et al. Modeling Gd³⁺ Complexes for Molecular Dynamics Simulations: Toward a Rational Optimization of MRI Contrast Agents. **Inorganic Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 11837–11858, 1 ago. 2022.

ORTIZ-COLLAZOS, S. et al. Interaction of levofloxacin with lung surfactant at the air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 689–696, 2017.

OSELIERO FILHO, P. L. et al. Structure and Thermotropic Behavior of Bovine- and Porcine-Derived Exogenous Lung Surfactants. **Langmuir**, v. 36, n. 48, p. 14514–14529, 8 dez. 2020a.

OSELIERO FILHO, P. L. et al. Structure and Thermotropic Behavior of Bovine- and Porcine-Derived Exogenous Lung Surfactants. **Langmuir**, v. 36, n. 48, p. 14514–14529, 8 dez. 2020b.

PARRA, E.; PÉREZ-GIL, J. **Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. Chemistry and Physics of Lipids**, 2015.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1 dez. 1981.

PATIL, S. et al. Hydroxyethyl substituted linear polyethylenimine for safe and efficient delivery of siRNA therapeutics. **RSC Advances**, v. 8, n. 62, p. 35461–35473, 2018.

PINAMONTI, G. et al. Elastic network models for RNA: A comparative assessment with molecular dynamics and SHAPE experiments. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 15, 2015.

PIRHADI, S.; AMANI, A. Molecular dynamics simulation of siRNA loading into a nanoemulsion as a potential carrier. **Journal of Molecular Modeling**, v. 26, n. 8, 2020.

QIAO, R. et al. Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer. **Nano Letters**, v. 7, n. 3, p. 614–619, 2007.

QIU, Y. et al. Optimization of PEGylated KL4 Peptide for siRNA Delivery with Improved Pulmonary Tolerance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 6, p. 2218–2232, 2021.

RAJA, M. A. G.; KATAS, H.; AMJAD, M. W. **Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2019.

ROBINSON, P. C. et al. The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19. **Med**, v. 1, n. 1, p. 90–102, 2020a.

ROBINSON, P. C. et al. Accumulating evidence suggests anti-TNF therapy needs to be given trial priority in COVID-19 treatment. **The Lancet Rheumatology**, v. 2, n. 11, p. e653–e655, 2020b.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, mar. 1977.

SAAD, S. M. I. et al. Effect of surfactant concentration, compression ratio and compression rate on the surface activity and dynamic properties of a lung surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 1, p. 103–116, jan. 2012.

SANDS, B. E.; KAPLAN, G. G. The role of TNF α in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 8, p. 930–941, 2007.

SCHULER, L. D.; DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1205–1218, 5 ago. 2001.

SEIFFERT, J. et al. Pulmonary toxicity of instilled silver nanoparticles: Influence of size, coating and rat strain. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

SIMBERG, D. et al. **DOTAP (and other cationic lipids): Chemistry, biophysics, and transfection. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 2004.

SMONDYREV, A. M.; BERKOWITZ, M. L. United atom force field for phospholipid membranes: Constant pressure molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidicholine/water system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 531–545, 15 abr. 1999.

SOUAILLE, M.; ROUX, B. Extension to the weighted histogram analysis method: combining umbrella sampling with free energy calculations. **Computer Physics Communications**, v. 135, n. 1, p. 40–57, mar. 2001.

SOUTSCHEK, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature**, v. 432, p. 173-178, 2004.

SOUZA, F. R. et al. Interaction of naringin and naringenin with DPPC monolayer at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 584, 2020a.

SOUZA, F. R. et al. Polymer-coated gold nanoparticles and polymeric nanoparticles as nanocarrier of the BP100 antimicrobial peptide through a lung surfactant model. **Journal of Molecular Liquids**, v. 314, 2020b.

SOUZA, F. R.; SOUZA, L. M. P.; PIMENTEL, A. S. Permeation of beta-defensin-3 encapsulated with polyethylene glycol in lung surfactant models at air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, p. 110357, out. 2019.

SOUZA, F. R.; SOUZA, L. M. P.; PIMENTEL, A. S. **Recent Open Issues in Coarse Grained Force Fields**. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020.

SOUZA, L. M. P. et al. Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 345–353, 2018.

SOUZA, L. M. P. et al. Tuning the hydrophobicity of a coarse grained model of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine using the experimental octanol-water partition coefficient. **Journal of Molecular Liquids**, v. 319, p. 114132, dez. 2020c.

SOUZA, P. C. T. et al. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, 2021.

SPOONER, C. E.; MARKOWITZ, N. P.; SARAVOLATZ, L. D. The role of tumor necrosis factor in sepsis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. S11–S17, jan. 1992.

STACHOWICZ-KUŚNIERZ, A. et al. The lung surfactant activity probed with molecular dynamics simulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 304, n. March, p. 102659, jun. 2022.

STARK, A. C.; ANDREWS, C. T.; ELCOCK, A. H. Toward Optimized Potential Functions for Protein–Protein Interactions in Aqueous Solutions: Osmotic Second Virial Coefficient Calculations Using the MARTINI Coarse-Grained Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 9, p. 4176–4185, 10 set. 2013.

STELZL, L. S. et al. Dynamic Histogram Analysis To Determine Free Energies and Rates from Biased Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 12, 2017.

STOJCESKI, F. et al. Molecular and Coarse-Grained Modeling to Characterize and Optimize Dendrimer-Based Nanocarriers for Short Interfering RNA Delivery. **ACS Omega**, v. 5, p. 2978–2986, 2020.

SUN, C.; TANG, T.; ULUDAG, H. A molecular dynamics simulation study on the effect of lipid substitution on polyethylenimine mediated siRNA complexation. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2822–2833, abr. 2013.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SWOPE, W. C. et al. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. **The Journal of Chemical Physics**, v. 76, n. 1, p. 637–649, 1 jan. 1982.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. **Chemical Physics Letters**, v. 28, n. 4, p. 578–581, 1974.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 2, p. 187–199, 1977a.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Monte Carlo study of a phase-separating liquid mixture by umbrella sampling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 66, n. 4, p. 1402–1408, 1977b.

TOUB, N. et al. Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, p. 607–620, 2006.

TRIBELLO, G. A. et al. A Molecular Dynamics Study of the Early Stages of Calcium Carbonate Growth. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 34, p. 11680–11687, 27 ago. 2009.

UUSITALO, J. J. et al. Martini Coarse-Grained Force Field: Extension to RNA. **Biophysical Journal**, v. 113, n. 2, 2017.

VALLE, R. P. et al. **Increasing hydrophobicity of nanoparticles intensifies lung surfactant film inhibition and particle retention**. ACS Sustainable Chemistry and Engineering. **Anais...**2014.

VALLE, R. P.; WU, T.; ZUO, Y. Y. Biophysical influence of airborne carbon nanomaterials on natural pulmonary surfactant. **ACS Nano**, v. 9, n. 5, 2015.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 9, p. 992–1023, 22 set. 1990.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, 2 mar. 2010.

VANOMMESLAEGHE, K.; MACKERELL, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 12, p. 3144–3154, 21 dez. 2012.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I.

Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 5 jul. 1967.

WANG, C. et al. Tumor targeted delivery of siRNA by a nano-scale quaternary polyplex for cancer treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 425, 2021.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 15 jul. 2004.

WANG, X.; LIN, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, nov. 2008.

WASSENAAR, T. A. et al. Computational Lipidomics with *insane* : A Versatile Tool for Generating Custom Membranes for Molecular Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 5, p. 2144–2155, 2015.

WINTHROP, K. L. et al. **SARS CoV-2 infection among patients using immunomodulatory therapies. Annals of the Rheumatic Diseases**, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 12 maio. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Global Tuberculosis Report 2023**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 12 maio. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO COVID-19 Dashboard**. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>>. Acesso em: 12 maio. 2024.

XIA, M.; CHAI, Z.; WANG, D. Polarizable and Non-Polarizable Force Field Representations of Ferric Cation and Validations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 23, p. 5718–5729, 15 jun. 2017.

YANG, W. et al. Block cationomer with flexible cationic segment enhances complexation with siRNA and the delivery performance in vitro. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 22, n. 1, p. 850–863, 2021.

YESYLEVSKYY, S. O. et al. Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 6, p. e1000810, 10 jun. 2010.

YOST, J.; GUDJONSSON, J. The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy: new implications for associated comorbidities. **F1000 Medicine Reports**, v. 1, n. 30, 2009.

YU, Z. et al. Nanomedicines for the delivery of glucocorticoids and nucleic acids as potential alternatives in the treatment of rheumatoid arthritis.

Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2020.

ZASADZINSKI, J. A. et al. The physics and physiology of lung surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n. 5–6, p. 506–513, nov. 2001.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZIMMERMANN, K. ORAL: All purpose molecular mechanics simulator and energy minimizer. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 310–319, 7 abr. 1991.

ANEXO A – Estrutura do fator de necrose tumoral (TNF)

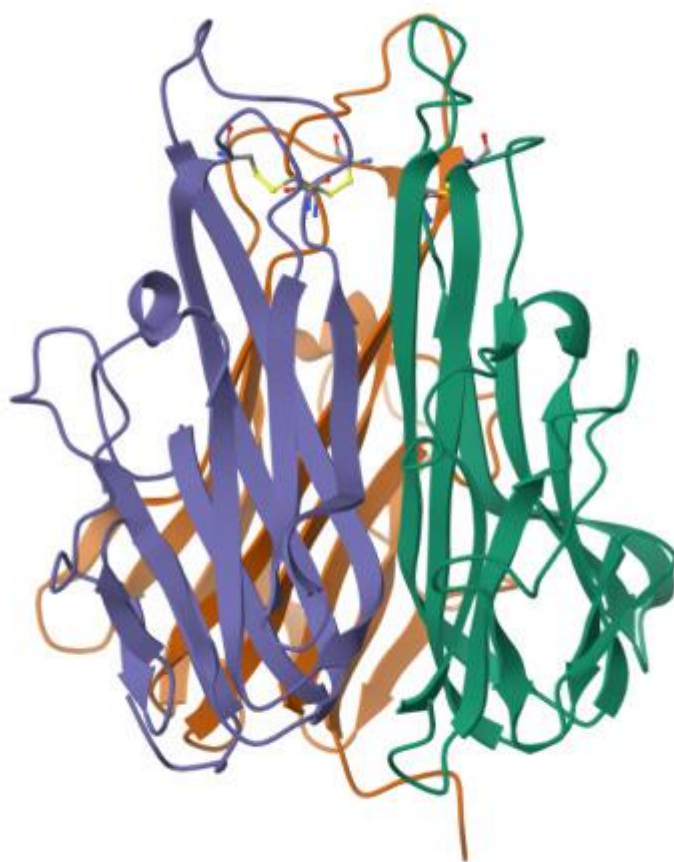


Imagem obtida de RCSB PDB ([RCSB.org](https://www.rcsb.org)) do PDB ID [1TNF](https://www.rcsb.org/entry/1TNF) (M. K. Eck, S. R. Sprang, The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding (1989) J. Biol. Chem 264: 17595-17605).

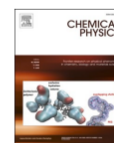
ANEXO B – Artigo publicado

Chemical Physics 563 (2022) 111704



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphys

Transposition of polymer-encapsulated small interfering RNA through lung surfactant models at the air-water interface

Lucas Miguel Pereira Souza, Mariana Camacho Lima, Luiz Filipe Silva Bezerra, André Silva Pimentel

Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 22453-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Small-interfering ribonucleic acid
RNA interference
Anti-TNF- α
Inflammation
Langmuir monolayer

ABSTRACT

Coarse-grained molecular dynamics were used to investigate different polymers to encapsulate the siRNA for its transposition through two lung surfactant models. These models consisted of a monolayer containing either 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) or a 70:30 mixture of DPPC and 1,2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*sn*-glycerol) (DPPG). The nanocarriers chosen to encapsulate the anti-TNF siRNA were polyethylene glycol (PEG) and polyethyleneimine (PEI). The simulations showed that the nanoparticles containing PEG promoted the lipid depletion of the lung surfactant model by forming a lipid corona. The nanoparticle containing only PEI, or both PEG and PEI showed some perturbation of the lung surfactant model, however no collapse during the nanoparticle transposition was observed. The umbrella sampling method was used to calculate the Gibbs free energy of transposition through the pure DPPC lung surfactant model. The nanoparticles containing PEG showed a decreased Gibbs free energy, while PEI alone has not affected it. The implication of this finding is that siRNA encapsulated with both PEI and PEG enhances the transposition of anti-TNF siRNA through lung surfactant models at the air-water interface.

ANEXO C – Trabalho premiado apresentado em seminário internacional



ANEXO D – Experimentos realizados em colaboração

Durante o período de vigência da bolsa oferecida pela CAPES, outros trabalhos experimentais de colaboração com relevância para o tema da saúde pulmonar foram realizados, mas ainda não foram publicados pois estão em andamento.

Um trabalho experimental de colaboração foi desenvolvido junto ao laboratório do prof. Dr. Ruud Veldhuizen (Department of Physiology & Pharmacology, Lawson Health Research Institute, Western University, Ontario, Canada) durante o período de doutorado sanduíche financiado pelo CAPES-PrInt. Durante o período no exterior, o efeito da fumaça de cigarros eletrônicos em células epiteliais pulmonares foi analisado através de ensaios de toxicidade (Figura 34) e permeabilidade. O gráfico abaixo mostra um ensaio de citotoxicidade que faz a medição indireta da quantidade de LDH (sigla do inglês para Lactato desidrogenase) que é liberado no meio de cultura após a morte celular. É possível ver que uma maior concentração de fumaça de cigarros eletrônicos no meio de cultura resulta em uma maior morte celular após 24 e 48h.

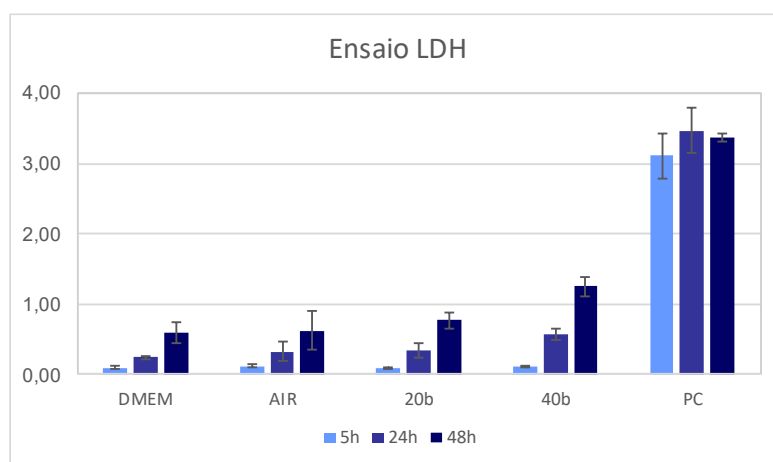


Figura 34. Ensaios de citotoxicidade de cigarros eletrônicos em células do tecido epitelial pulmonar.

Utilizando microscopia de força atômica, as forças de interação entre o surfactante pulmonar e nanopartículas de siRNA (diferente do siRNA utilizado neste projeto) têm sido experimentalmente avaliadas em colaboração com grupo parceiro da UFRJ e LNNano. A Figura 35 ilustra o princípio do experimento e como se calculam as forças de adesão da lignina em uma superfície de celulose.(NASCIMENTO et al., 2022) É possível realizar novas simulações que

tenham comparação direta com o experimento, com atenção às limitações, como por exemplo, o tamanho da nanopartícula na simulação, que não pode ser o mesmo do experimento devido ao alto custo computacional.

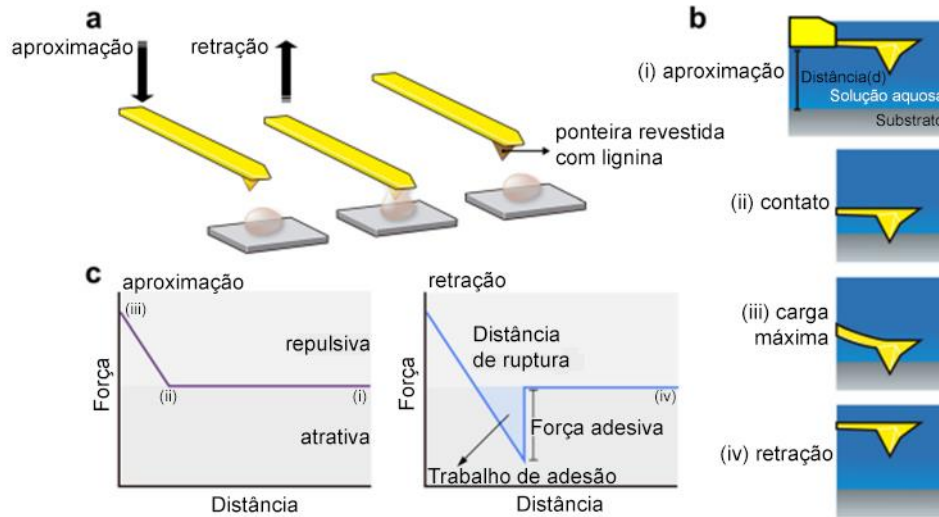


Figura 35. Ilustração da microscopia de força atômica utilizada para o cálculo das forças de adesão entre nanopartículas de siRNA e uma superfície recoberta por surfactante pulmonar. Imagem traduzida e adaptada de Nascimento (2022).