



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Terapia Génica Mitocondrial
Desenvolvimento de um vetor com afinidade pela
mitocôndria

Carolina Vicente Santos Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Diana Costa
Co-orientador: Prof. Doutora Carla Cruz

Covilhã, outubro de 2015

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Diana Costa e à co-orientadora Professora Doutora Carla Cruz pela aprendizagem, ajuda, apoio e disponibilidade que me deram durante a execução e escrita da minha dissertação de mestrado e pelos desafios propostos durante este ano que passou.

Queria também agradecer à Eng^a Ana Paula por me acompanhar na aquisição das imagens do SEM e à Cátia Batista pela aprendizagem e acompanhamento prestados nestes últimos meses. Aos meus colegas de laboratório pela disponibilidade, amizade, bom ambiente e convívio que se fizeram notar praticamente todo o ano.

Aos meus amigos de longa data que me providenciaram bons momentos, ao Artur pelo carinho e dedicação e por fim aos meus pais por todo o suporte e confiança prestados em toda a minha vida.

Obrigada.

Resumo

Para além dos 23 pares de cromossomas que uma célula contem, o genoma humano também é constituído pelo genoma mitocondrial. A principal função da mitocôndria é a produção de níveis altos de energia (ATP) usada pelas células por via da respiração aeróbia. Como consequência desta função, a produção de espécies reativas de oxigénio pode danificar o mtDNA, organelos celulares e a própria célula. Comparativamente com o nDNA, a taxa de mutações no mtDNA é superior devido à falta de mecanismos de proteção e de reparação. Como resultado, ocorrem danos em células e tecidos que dependem níveis mais elevados de energia como é o caso do cérebro, coração e fígado. Atualmente estão associadas doenças que resultam das mutações ocorridas no genoma mitocondrial, como é o caso de MELAS, MERRF e SL.

Desta forma, é necessário a introdução de novos genes mitocondriais com vista a restabelecer as funções perdidas pelo organelo, como é o caso da terapia de genes mitocondrial.

Esta dissertação de mestrado tem como base o desenvolvimento de um transportador incorporando o gene mitocondrial ND1 que consiga entregar eficazmente o DNA plasmídico (pDNA) à mitocôndria e que possa, futuramente, ser usado como uma alternativa para a terapia génica mitocondrial. A introdução de compostos fluorescentes às nanopartículas torna-se a principal novidade deste projeto.

Este projeto foi dividido em 2 etapas:

1. Síntese e caracterização de compostos fluorescentes;
2. Síntese e caracterização das nanopartículas à base de carbonato de cálcio pelo método de co precipitação.

As nanopartículas à base de carbonato de cálcio, incorporadas com os compostos fluorescentes e o plasmídeo, oferecem qualidades únicas como biocompatibilidade, baixo custo e facilidade de produção. Parâmetros como a morfologia, tamanho, potencial zeta, capacidade de encapsulamento, degradabilidade e biocompatibilidade foram testados neste trabalho.

Os resultados demonstraram que as nanopartículas têm capacidade e características ideais para futuros ensaios *in vitro* e expressão da proteína correspondente ao gene ND1.

Em suma, através do conhecimento já adquirido de outros protocolos de terapia génica mitocondrial e a realização deste vetor não viral com afinidade pela mitocôndria traz avanços importantes no tratamento a diversas patologias associadas à mitocôndria

Palavras-chave

Citopatias mitocondriais, Compostos fluorescentes, DNAm, mitocôndria, nanopartículas, Terapia génica mitocondrial; pDNA.

Abstract

Beyond of 23 pairs of chromosomes that cell contains, the human genome is also comprises by mitochondrial genome. The main function of mitochondrion is the production of high levels of energy (ATP) used by cells via aerobic respiration. As consequence of this function, the production of reactive oxygen species can cause damage in mtDNA, in cell organelles and in cell itself.

Comparing to nDNA, the rate of mutation in mtDNA is higher due to the lack of protection and repair mechanisms. As result, damage can occur in cells and tissues that expend higher energy levels like brain, heart and liver. Nowadays, are associated diseases as effect of mutations occurred in mitochondrial genome as MELAS, MERRF and LS.

So, is necessary an introduction of new mitochondrial gene in order to restore the lost functions by the organelle, as is the case of mitochondrial gene therapy.

The main objectives of this master dissertation are the development of a carrier incorporating a mitochondrial ND1 gene that can deliver effectively pDNA into mitochondrion and, from now on, can be used as an alternative for mitochondrial gene therapy. The introduction of fluorescents compounds into nanoparticle, became novelty of this project.

This project is divided in 2 parts:

1. Synthesis and characterization of fluorescent compounds;
2. Synthesis and characterization of calcium carbonate based nanoparticles by co-precipitation method.

Calcium carbonate based nanoparticles, incorporated with fluorescents compounds and pDNA, provides qualities like biocompatibility, low cost and easier production.

Parameters such as morphology, size, zeta potential, encapsulation ability, degradability and biocompatibility were tested.

The results demonstrate that nanoparticles have capacity and promising characteristics for further tests *in vitro* and protein expression of ND1 gene.

Briefly, the knowledge already acquired concerning others protocols of mitochondrial gene therapy and the achievement of this non-viral vector with affinity for the mitochondria can provides new insights in the treatment of various diseases associated with mitochondria.

Keywords

Mitochondrial cytopathies, fluorescents compounds, mitochondria, nanoparticle, mitochondrial genetic therapy, pDNA.

Índice

Introdução	1
1. A mitocôndria	3
1.1. Funções da mitocôndria	4
1.1.1. Fosforilação oxidativa	4
1.1.2. Espécies reativas de oxigénio	5
1.1.3. Regulação do cálcio na mitocôndria	6
1.1.4. Regulação da apoptose	6
1.2. DNA mitocondrial	8
1.3. Mecanismos de reparação do DNA mitocondrial	9
1.4. Herança mitocondrial	9
1.5. Mutações e doenças mitocondriais	10
2. Terapia génica não-viral	13
2.1. Terapia génica mitocondrial	15
2.2. Nanopartículas	15
3. Objetivos do trabalho	18
4. Materiais e métodos	19
4.1. Materiais	20
4.1.1. Reagentes	20
4.2. Equipamentos	20
4.3. Métodos	21
4.3.1. Síntese de compostos- Procedimento Experimental	21
4.3.1.1. Síntese do composto 4,5-di(bromometil)acridinia (Composto B)	21
4.3.1.2. Tosilação da dietilenotriamina (composto E)	22
4.3.1.3. Tosilação da trietilenotetramina (composto G)	23
4.3.1.4. Tosilação da tripropilenotetramina (composto I)	24
4.3.1.5. Adição dos compostos E, G e I ao composto C	24
4.3.1.6. Remoção dos grupos tosilo dos compostos J, K e L	26
4.3.1.7. Síntese do composto R: 1-naftaldeído e tris (2-aminoetil)amina	27
4.3.1.8. Síntese do composto T: 2-quinolina carboxaldeído e dietilenotriamina	28
4.3.1.9. Síntese do composto X: 2-quinolina carboxaldeído e tetraetilenopentamina	29
4.3.2. Avaliação da citotoxicidade dos compostos N, S, U e X pelo método MTT	30
4.3.3. Preparação e purificação do plasmídeo pCAG-ND1	31
4.3.4. Síntese das nanopartículas	31

4.3.5. Caracterização das nanopartículas	32
4.3.5.1. Morfologia das nanopartículas	32
4.3.5.2. Eficiência de encapsulação do pDNA	32
4.2.5.3. Zeta potencial e tamanho das nanopartículas	32
4.3.6. Teste de proteção das nanopartículas	33
4.3.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas	33
5. Resultados	35
5.1. Síntese dos compostos	36
5.2. Citotoxicidade dos compostos M, R, T e X pelo método MTT	38
5.3. Amplificação e purificação do plasmídeo	39
5.4. Síntese e caracterização das nanopartículas de CaCO ₃	40
5.5. Morfologia das nanopartículas	41
5.6. Tamanho das nanopartículas	45
5.7. Potencial Zeta das nanopartículas	46
5.8. Eficiência de encapsulação do pDNA	48
5.9. Teste de proteção das nanopartículas	49
5.10. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas	50
6. Discussão	51
6.1. Conclusões e perspetivas futuras	54
Referencias Bibliográficas	55

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema representativo da cadeia transportadora de eletrões. A azul estão representadas as subunidades mitocondriais do Complexo I, a verde do Complexo III, a vermelho do Complexo IV e a amarelo do Complexo V.

Figura 2- Espécies reativas de oxigénio e via dos danos oxidativos. MnSOD (superóxido dismutase contem Manganês); GPx (glutathione peroxidase); CuZnSOD (superóxido dismutase contem Cobre-Zinco)

Figura 3- Esquema geral da apoptose em mamíferos.

Figura 4- Visão geral do DNA mitocondrial humano. Os genes que codificam para as subunidades do Complexo I (azul) são ND1-ND6 e ND4. Genes para o Complexo III (verde) são Cytb. Os genes para o Complexo IV (vermelho) são COI-COIII e os genes para o Complexo V (amarelo) são 8 e 6. Os 22 tRNA são identificados com uma letra, os 2 rRNA codificados pelo mtDNA são 12S e 16S.

Figura 5- Representação esquemática de sistemas de transporte para a entrega de fármaco em células alvo.

Figura 6- Perfil da citotoxicidade para 0,01 μ M de compostos R, T, M e X em fibroblastos humanos após 24, 48 e 72 h de incubação, tal como medido no ensaio de MTT. As percentagens de viabilidade celular são expressas relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 0,05%. As barras de erro na figura representam os desvios padrão (isto é, \pm SD) das 3 experiências.

Figura 7- Efeito do perfil da concentração dos compostos M, R e T em fibroblastos humanos após 72 h de incubação. A percentagem de viabilidade é expressa relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 0,05%.

Figura 8- Eletroforese em gel de agarose do pCAG-ND1 purificado. Faixa 1-marcador de DNA; Faixa 2 - controlo de pCAG-ND1; Faixa 3 e 4- plasmídeo purificado.

Figura 9- Estrutura molecular da celulose e gelatina, respetivamente.

Figura 10- Morfologia das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados. Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto M/celulose (A e B). Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto M/gelatina (C e D). Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto M/celulose (E e F). Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto M/gelatina (G e H). Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto R/celulose (I e J). Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto R/gelatina (K e L). Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto R/celulose. (M e N). Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto R/gelatina (O e P). Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto T/celulose (Q e R). Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina (S e T). Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto T/celulose. (U e V). Sistema 10µg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina (W e X).

Figura 11- Tamanho da nanopartícula (nm) para os diferentes sistemas.

Figura 12- Potencial ζ das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados.

Figura 13- Percentagem de eficiência de Encapsulação de pCAG-ND1 (%EE) das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados. Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD) com n=3.

Figura 14- Eletroforese em gel de agarose 1% para os sistemas estudados incubados em FBS (10%) + PBS (10%) durante 30 min a 37 °C. Faixa 1- controlo 5µg pCAG-ND1; Faixa 2- 5µg pDNA/FBS+PBS; Faixa 3- Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto M/celulose; Faixa 4- Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto M/gelatina; Faixa 5- Sistema 5µg pCAG-ND1/Composto R/celulose; Faixa 6 - Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto R/gelatina; Faixa 7- Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto T/celulose; Faixa 8-Sistema 5µg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina; Faixa 9- controlo 10 µg de pCAG-ND1; Faixa 10- 10 µg pDNA/FBS+PBS; Faixa 11- Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto M/celulose; Faixa 12- Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto M/gelatina; Faixa 13- Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto R/celulose; Faixa 14-Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto R/gelatina; Faixa 15- Sistema 10µg pCAG-ND1/Composto T/celulose; Faixa 16- Sistema 10µg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina.

Figura 15- Perfil da citotoxicidade das nanopartículas em fibroblastos humanos após 48h de incubação. As percentagens de viabilidade celular são expressas relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 1%. As barras de erro na figura representam os desvios padrão (isto é, \pm SD) das 3 experiências.

Lista de Esquemas

Esquema 1- Esquema geral da reação da acridina com 2-bromometil etil éter.

Esquema 2- Esquema geral da reação de tosilção da dietilenotriamina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila

Esquema 3- Esquema geral da reação de tosilção da tietilenotriamina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila.

Esquema 4- Esquema geral da reação de tosilção da tripropilenotetramina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila.

Esquema 5- Esquema geral da adição da dietilenotriamina tosificada ao composto mono(bromometiletil)acridina.

Esquema 6- Representação esquemática dos compostos K e L.

Esquema 7- Esquema geral da remoção dos grupos protetores tosilos ao composto J.

Esquema 8- Representação esquemática dos compostos N e Q.

Esquema 9- Esquema geral da tris (2-aminoetil) amina com o 1-naftaldeído.

Esquema 10- Esquema geral da dietilenotriamina com a 2-quinolina carboxaldeído.

Esquema 11- Esquema geral da tetraetilenopentamina com a 2-quinolina carboxaldeído

Esquema 12- Esquema geral de formação de iminas e posteriores amins secundárias a partir de uma amina primária e aldeído.

Esquema 13- Estruturas químicas dos compostos sintetizados e utilizados neste trabalho.

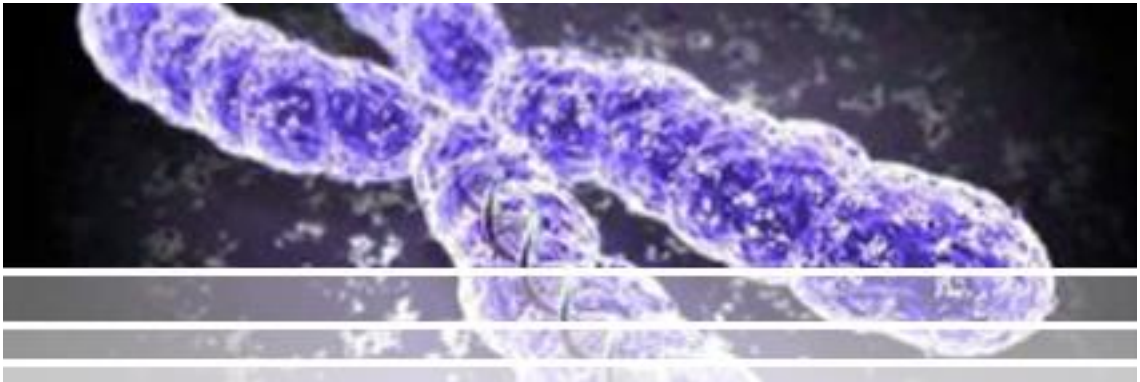
Lista de Tabelas

Tabela 1- Patologias e Manifestações clinicas associadas às mutações nos genes mitocondriais.

Tabela 2- Medições do potencial zeta (mV) para o plasmídeo pCAG-ND1, para os polímeros celulose e gelatina e para os compostos R e T.

Lista de Acrónimos

ADP	Adenosina difosfato
AP	Apurínico/apurimídico
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	ião cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
cit c	Citocromo c
Cl ⁻	ião cloreto
D ₂ O	Água deuterada
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de encapsulação
ERO	Espécie Reativa de Oxigénio
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Kpb	Kilo pares de bases
LHON	Leber's Hereditary optic neuropathy (Neuropatia ótica Hereditária de Leber)
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios de AVC)
MERF	Myoclocic epilepsy and ragged-red-fiber (Epilepsia mioclônica e fibras vermelhas rasgadas)
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
nDNA	DNA nuclear
oc	Open circular (circular aberta)
·OH	Radical hidroxilo
OXPPOS	Oxidação fosforilativa
pDNA	DNA plasmídico
Pi	Fosfato inorgânico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rRNA	RNA ribossomal
sc	Supercoiled (super enrolada)
tRNA	RNA transferência



Introdução

As mitocôndrias são organelos intracelulares existindo em número variável em células eucarióticas e dependentes de metabolismo aeróbio.

A maior função da mitocôndria nas células é a produção de ATP através da fosforilação oxidativa. Além disso, a mitocôndria participa em muitos outros mecanismos importantes no funcionamento de uma célula, como, por exemplo, regulação da apoptose, modulação da concentração intracelular do cálcio, geração e regulação de espécies reativas de oxigénio (Cwerman-Thibault et al. 2014). Este organelo é constituído no mínimo por 1500 proteínas, nas quais os seus genes são codificados tanto pelo DNA nuclear (nDNA) como pelo DNA mitocondrial (mtDNA). O funcionamento perfeito da mitocôndria irá depender da interação apropriada dos dois genomas (Cwerman-Thibault et al. 2011).

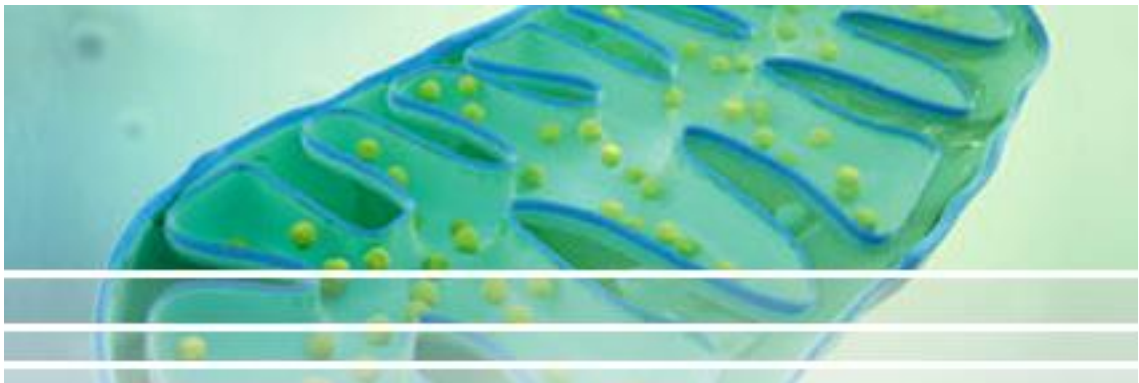
Todavia, a cadeia respiratória mitocondrial é a maior fonte de radicais livres que contribuem para um elevado número de doenças humanas. Existem mais de 200 patologias associadas a diferentes distúrbios neuromusculares, encefalomiopatias, cardiomiopatia, que compreendem mutações em genes de tRNA mitocondriais e mutações em genes que codificam as subunidades da cadeia respiratória (DiMauro & Hirano 2005). Na atualidade, 15-20% dos pacientes demonstram doenças referentes a mutações mitocondriais, sendo o restante causado por mutações em genes nucleares (Cwerman-Thibault et al. 2011).

A aplicação de novas estratégias que permitem repor genes em falta ou manipular os genes defeituosos trará um efeito benéfico em termos do restabelecimento da função normal de uma proteína, o que poderá constituir um tratamento efetivo para as doenças alvo. Neste caso, a incorporação de um vetor terapêutico tendo como alvo o mtDNA irá permitir o restabelecimento de genes mutados do metabolismo energético da célula.

O uso de vetores virais para aplicações terapêuticas é frequente devido à sua alta capacidade de transfeção, todavia estão associados a grandes riscos de segurança (Thomas et al. 2003). Presentemente, a utilização de vetores não-virais tem aumentado dia após dia devido às suas propriedades intrínsecas de não apresentar resposta imunitária, de terem uma facilidade de produção em grande escala; ainda assim apresentam baixa eficiência de transfeção, o que se torna uma limitação do uso deste tipo de vetores (Limberis 2012).

No campo da nano medicina têm-se desenvolvido esforços para a criação e desenvolvimento de novos sistemas para a entrega celular da carga terapêutica (Vercauteren et al. 2012). A aplicação de polímeros a estes sistemas permite melhorar a estabilidade do próprio dispositivo de entrega, oferecer proteção das enzimas digestivas e ter uma maior capacidade de carga do vetor.

A introdução de compostos fluorescentes nas nanopartículas apresenta-se como uma novidade nesta dissertação, com o objetivo de não só permitir a visualização do sistema após o momento de transfeção celular, como garantir o direcionamento para a mitocôndria.



1. A mitocôndria

As mitocôndrias são organelos celulares de dimensões 0,5- 1 μ m (Collombet & Coutelle 1998) constituídas por uma membrana externa que apresenta uma permeabilidade a moléculas menores ou iguais que 5000 Dalton (Yamada & Harashima 2008). Essas moléculas podem entrar no espaço membranar, mas a maioria delas não pode atravessar a membrana interna (Lesnefsky et al. 2001). Apresentam também um espaço intramembranar cuja composição é semelhante à do citosol e uma membrana interna que se prolonga para o interior da matriz mitocondrial, designadas de cristas mitocondriais que aumentam a superfície de área, e consequente produção de ATP. A matriz mitocondrial alberga o mtDNA, o complexo multi-enzimático piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via da oxidação dos ácidos gordos (Nelson & Cox 2008)

Algumas proteínas mitocondriais, como por exemplo enzimas pertencentes à cadeia respiratória, são codificadas pelo genoma nuclear. Elas são sintetizadas no citoplasma e direcionadas para a mitocôndria através de uma sequência de direcionamento mitocondrial (Chinnery & Schon 2003).

1.1. Funções da Mitocôndria

1.1.1. Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa é um processo essencial na vida celular de organismos aeróbios pois é desta forma que obtêm a sua fonte principal de energia útil. Trata-se de um mecanismo onde há transferência de eletrões ao longo da cadeia respiratória e igualmente formação de grupos fosfatos de altos níveis de energia - ATP.

A cadeia de transporte de eletrões está localizada na membrana interna da mitocôndria e é constituída por 4 grandes complexos de enzimas: *Complexo I (NADH desidrogenase)*, *Complexo II (Sucinato desidrogenase)*, *Complexo III (Citocromo c redutase)* e *Complexo IV (citocromo oxidase)* (Boekema & Braun 2007).

Por último, a formação de ATP tem origem no Complexo V, também denominado por *ATP Sintetase* (Boekema & Braun 2007).

As moléculas NADH e FADH conduzem os eletrões para os *Complexos I e II*, sendo a aceitação dos eletrões, no primeiro complexo, por reações catabólicas existentes na matriz mitocondrial e no segundo complexo por eletrões provenientes do succinato para a *ubiquinona* que se conecta diretamente com o Ciclo de Krebs (Dudkina et al. 2008).

Os eletrões são então transferidos para o próximo complexo enzimático, o *Complexo III*, e posteriormente para o *citocromo c*. Deste passam para o *Complexo IV*, representando um complexo terminal da cadeia respiratória, que catalisa a redução de O₂ para H₂O. Por fim, o *Complexo V* permite a passagem dos protões de volta à matriz mitocondrial e usa a energia libertada por esse gradiente eletroquímico para a formação de ATP, através de ADP e Pi (Schultz & Chan 2001).

Todos os complexos são codificados pelo DNA mitocondrial e DNA nuclear à exceção do *Complexo II* que é somente codificado pelo DNA nuclear (Zeviani & Di Donato 2004).

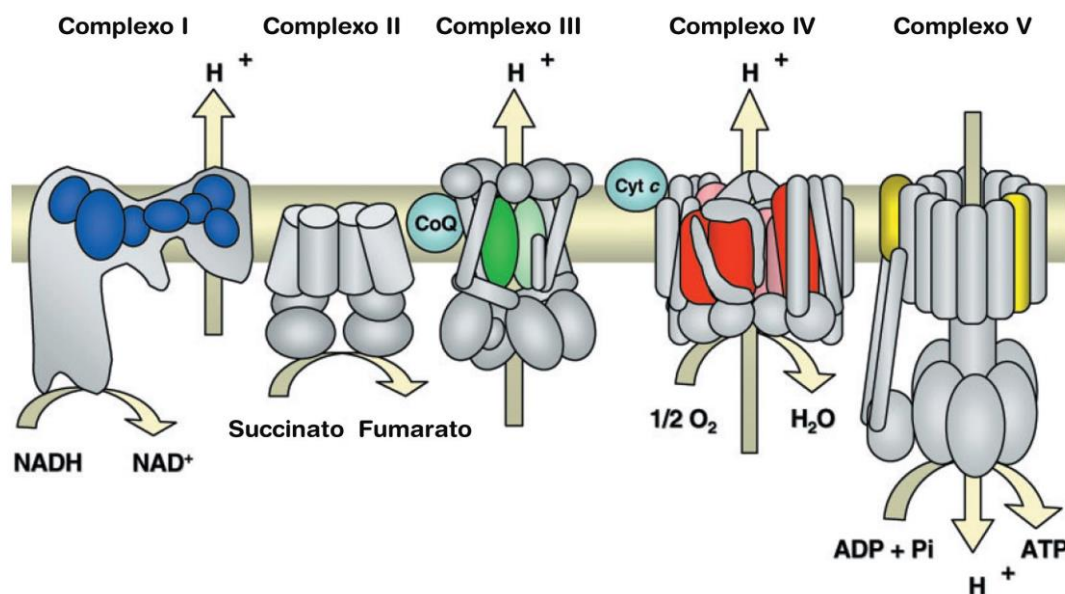


Figura 1- Esquema representativo da cadeia transportadora de elétrons. A azul estão representadas as subunidades mitocondriais do *Complexo I*, a verde do *Complexo III*, a vermelho do *Complexo IV* e a amarelo do *Complexo V* (adaptado de Zeviani & Di Donato 2004).

1.1.2. Espécies Reativas de Oxigénio

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigénio (ERO). A sua produção não controlada de ERRO leva a anomalias celulares, tais como: oxidação de lípidos, danos em proteínas, genoma nuclear e genoma mitocondrial (Murphy & Smith 2000).

Maioritariamente do oxigénio absorvido pelos organismos aeróbios é reduzido em água, apenas de 2-4% do oxigénio é reduzido univalentemente, ou seja, apenas recebe um elétron originando o radical anião superóxido (O_2^-) (Lesnfsky et al. 2001). Além disso, o oxigénio também está envolvido na formação de outras espécies reativas de oxigénio, como peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Leon et al. 2004).

Porém, normalmente, as espécies reativas de oxigénio geradas na mitocôndria são neutralizados por sistemas naturais de defesa da própria célula, como é o caso das enzimas catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (Takao et al. 1998).

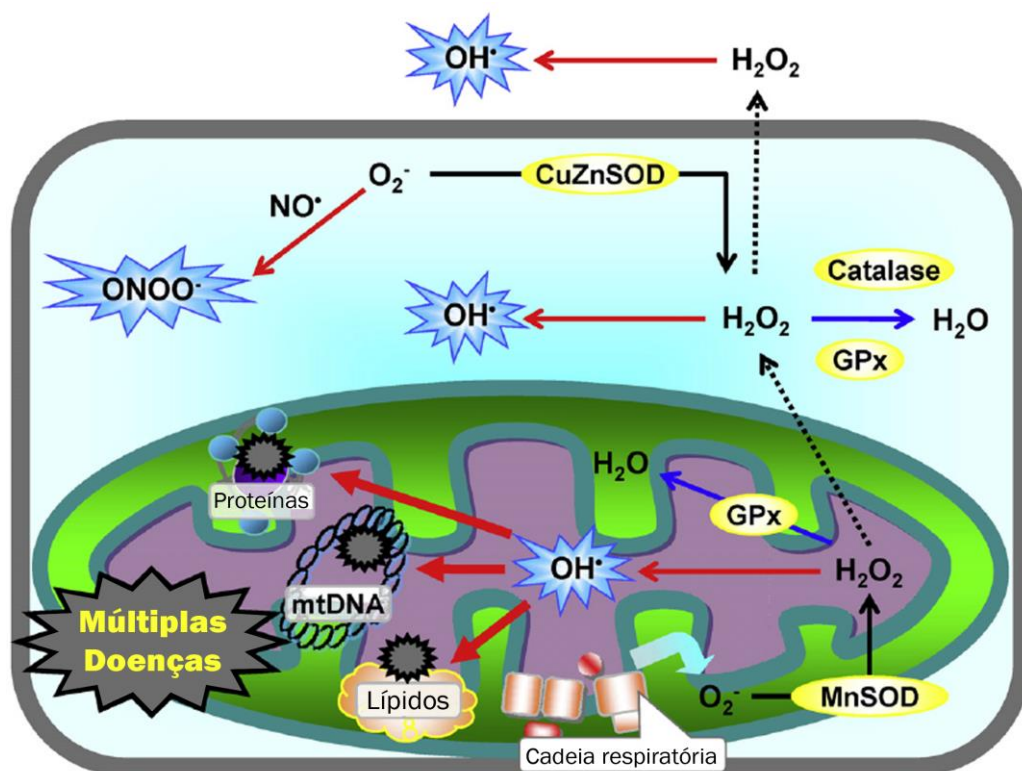


Figura 2- Espécies reativas de oxigênio e via dos danos oxidativos. MnSOD (superóxido dismutase contem Manganês); GPx (glutathiona peroxidase); CuZnSOD (superóxido dismutase contem Cobre-Zinco) (adaptado de Yamada & Harashima 2008).

1.1.3. Regulação do Cálcio na mitocôndria

A regulação do cálcio (Ca^{2+}) pela mitocôndria é muito importante na regulação na resposta de sinais intra e extracelulares (Satrústegui et al. 2007).

A entrada de Ca^{2+} no interior da mitocôndria resulta num aumento das atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico, aumentando assim a produção de NADH e consequente aumento de produção de ATP (Griffiths et al. 1998). Quando há uma sobrecarga de cálcio na matriz mitocondrial, este interage com a ciclofilina D, induzindo a abertura de um poro originando um aumento de água e posterior rutura da membrana mitocondrial (Martin 2012); (Jeong & Seol 2008).

1.1.4. Regulação da Apoptose

A apoptose ou morte celular programada é um processo essencial na homeostasia celular para a manutenção de processos normais fisiológicos e eliminação de células desnecessárias ou perigosas, dos quais se destacam doenças degenerativas e processos cancerígenos (Indran et al. 2011). As mitocôndrias, para além de serem conhecidas como

principais produtoras de energia, também apresentam um papel central no controlo da apoptose.

Existem duas principais vias que desencadeiam a apoptose: a via extrínseca ou via do recetor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial (Wang & Youle 2009).

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada em resposta a um vasto leque de estímulos apoptóticos, desde radicais livres, infeções virais (Indran et al. 2011), danos do DNA, radiação ultravioleta (Suen et al. 2008). Estes estímulos resultam numa interrupção da permeabilidade da membrana mitocondrial interna e consequente perda do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) levando a um estado irreversível apoptótico (Kroemer et al. 1998) e libertação de duas proteínas pro-apoptóticas para o citosol (Martinou & Youle 2011).

Uma dessas proteínas, citocromo c, induz um processo *downstream* de ativação de uma família de proteínas -caspases- e posterior morte celular. Uma vez libertado da mitocôndria atua em conjunto com outras proteínas a Apaf-1 e a caspase-9, ativando a caspase-3 para posterior degradação nuclear (Budihardjo et al. 1999).

Paralelamente, a proteína *Smac* associa-se a *Proteínas Inibidoras de Apoptose* progredindo assim a morte celular programada (Indran et al. 2011; Adams & Cory 2001).

Ainda se destacam proteínas importantes no papel do controlo da mitocôndria na apoptose, com funções anti-apoptóticas. A presença das proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x) inibe a libertação do citocromo c e da proteína *Smac*, evitando assim, a ativação das caspases e a consequente morte celular (Tsujimoto 1998; Adams & Cory 2001).

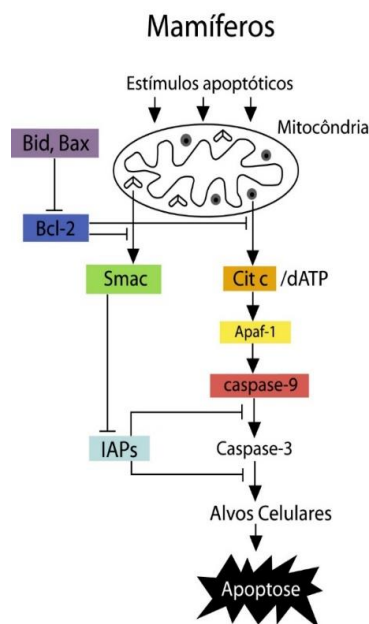


Figura 3- Esquema geral da apoptose em mamíferos. (adaptado de Shi 2001).

1.2. DNA Mitocondrial

O genoma mitocondrial replica-se independentemente do DNA genómico e está presente em grandes quantidades de cópias, aproximadamente entre 10.000-100.000 nas células mamíferas (Chatterjee et al. 2006).

O DNA mitocondrial humano, presente na matriz mitocondrial, é pequeno, de cadeia dupla circular fechada e com 16,6kpb (DiMauro 2001). As suas duas cadeias possuem densidades distintas devido à sua diferente constituição. A cadeia interior, cadeia leve (*Light strand*), é rica em resíduos de citocinas, enquanto a cadeia pesada (*Heavy-strand*) é rica em resíduos de guanina (Wallace 1992). Contém 37 genes, dos quais 22 genes que codificam o tRNA, 13 genes que codificam subunidades do sistema de fosforilação oxidativa e por fim 2 genes que codificam o rRNA (Pakendorf & Stoneking 2005).

O genoma mitocondrial não possui intrões, apenas existem duas regiões não codificantes, *D-Loop* (com 1kb) onde está localizada a origem de replicação da cadeia pesada (O_H) e uma outra região a 2/3 do genoma (com 30pb), onde se localiza a origem de replicação da cadeia leve (O_L) (Wong & Clayton 1985); (Wallace 1992).

A replicação de uma nova cadeia do mtDNA inicia-se a partir da origem de replicação da cadeia pesada (O_H) e prossegue na direção da origem de replicação da cadeia leve (O_L), onde neste ponto é sintetizada uma nova cadeia em sentido contrário até ambas as cadeias estarem replicadas (Shadel & Clayton 1997).

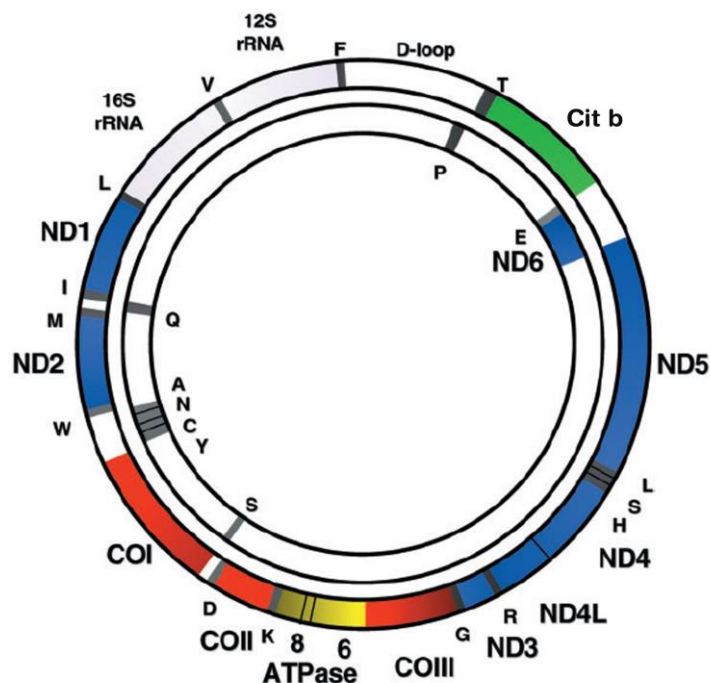


Figura 4 - Visão geral do DNA mitocondrial humano. Os genes que codificam para as subunidades do *Complexo I* (azul) são ND1-ND6 e ND4L. Genes para o *Complexo III* (verde) são *cit b*. Os genes para o *Complexo IV* (vermelho) são COI-COIII e os genes para o *Complexo V* (amarelo) são 8 e 6. Os 22 tRNA são identificados com uma letra, os 2 rRNA codificados pelo mtDNA são 12S e 16S. (*adaptado de Zeviani & Di Donato 2004*).

1.3. Mecanismos de Reparação do DNA Mitocondrial

Várias lesões que ocorrem tanto no DNA mitocondrial como no DNA nuclear, se não forem reparadas, podem originar disfunções nas células e tecidos, degeneração neurológica, envelhecimento e em casos, mais severos, cancro (Croteau & Bohr 1997).

A proximidade do DNA mitocondrial à cadeia transportadora de eletrões, torna-se um ponto vulnerável a lesões, sendo responsável pelo aumento de mutações comparativamente com o DNA nuclear (Croteau et al. 1999).

A mitocôndria tem os seus próprios mecanismos de reparação, que se assemelham aos do DNA nuclear, mas apesar da manutenção do genoma mitocondrial ainda não ser compreendida, o interesse pelos seus mecanismos de reparação tem aumentado cada vez mais (Croteau et al. 1999) e (Larsen et al. 2005).

A Reparação de Excisão de Bases (REB) é o mecanismo principal e mais bem caracterizado de reparação de bases mitocondriais (Kazak et al. 2012). É um processo que envolve várias etapas de remoção e substituição de bases lesadas por alquilação, desaminação e oxidação (Robertson et al. 2009).

Na reparação de bases são utilizadas duas vias: a *via curta*, que apenas repara um nucleótido e, em contraste, a *via longa*, que repara no mínimo dois nucleótidos (Robertson et al. 2009).

A primeira etapa inicia-se com o reconhecimento de uma base lesada pela DNA glicosilase, que cliva a ligação N-glicosídica criando um local não básico, ou seja, local apurínico ou apirimidínico (*AP site*). O processo continua com a AP endonuclease que forma uma cadeia simples de DNA (Chen et al. 2003).

A inserção de nucleótidos corretos é feita pela DNA polimerase mitocondrial gama. É a única polimerase conhecida presente na mitocôndria humana e participa em todas as funções metabólicas do DNA mitocondrial. Por fim, o último passo do mecanismo da reparação de bases por excisão é selado pela DNA ligase III (Larsen et al. 2005).

1.4. Herança Mitocondrial

A herança mitocondrial não segue a herança mendeliana, apenas e exclusivamente as mitocôndrias são transmitidas pela mãe, isto é devido à degradação da mitocôndria paternal após a fertilização do oócito (Heller et al. 2012).

Durante a divisão celular, as mitocôndrias são distribuídas pelas células filhas de forma aleatória, resultando em 2 tipos de população. Uma população com o mtDNA *wild-type* e outra população com algum mtDNA mutado. No caso em que a população do DNA mitocondrial é igual, ou seja, DNA mutado ou saudável, é chamada de homoplasia. Nas situações em que há mutação e genoma saudável é chamada heteroplasia (DiMauro 2001).

Nestes casos, a heteroplasia não significa necessariamente que o indivíduo apresente um fenótipo. É necessário que o nível de mutações exceda um limite, também conhecido por *threshold*. Este limite varia de mutação para mutação e de tecido para tecido (Chinnery & Schon 2003)

1.5. Mutações e Doenças Mitocondriais

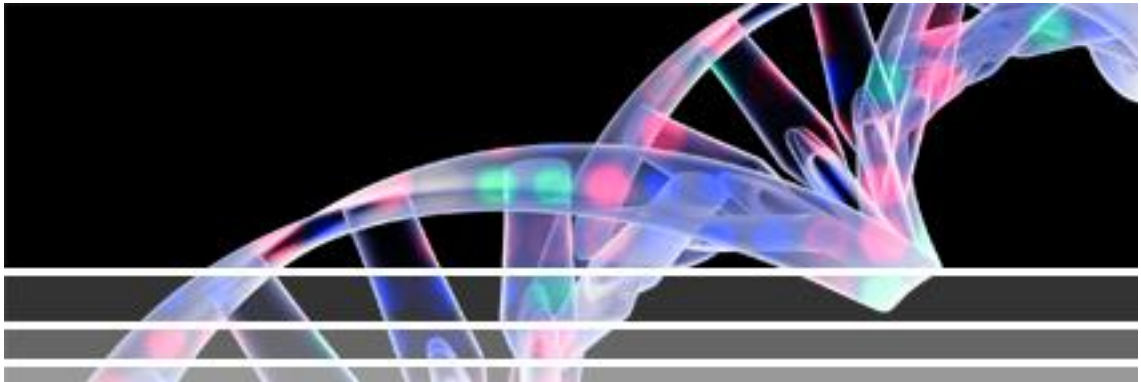
As doenças mitocondriais humanas são devidas a mutações herdadas pela mãe ou então mutações espontâneas que ocorrem no nDNA ou mtDN, dando origem a uma inadequada produção de energia. As mutações mitocondriais afetam principalmente tecidos que exigem uma grande quantidade de ATP como o caso do cérebro, músculo, coração, rins, fígado e sistemas endócrinos (Murphy & Smith 2000).

A falta de histonas, a proximidade do genoma mitocondrial à cadeia transportadora de eletrões, a escassez de mecanismos de reparação de DNA, a auto replicação/expressão da mitocôndria e a falta de exões são fatores que tornam mais suscetível as mutações no mtDNA comparando com o nDNA (Adhya et al. 2011).

As citopatias mitocondriais (Tabela 1) correspondem a um grupo de doenças largamente heterogéneo e muitas das vezes não há uma relação genótipo-fenótipo, ou seja, mutações no mesmo gene podem manifestar diferentes fenótipos e em contrapartida, o mesmo fenótipo pode ser produzido por diferentes mutações (Rodenburg 2011) onde se exibem variadas aparências clínicas nas quais o envolvimento muscular e cerebral é frequente. Muitas mutações que têm sido descritas na literatura maioria delas são mutações que ocorrem em genes que codificam para o *complexo I* e tRNAs (Mazunin et al. 2010).

Tabela 1- Patologias e Manifestações clínicas associadas às mutações nos genes mitocondriais.

<i>Patologia</i>	<i>Manifestação clínica</i>	<i>Mutação em genes mitocondriais</i>
<p>Neuropatia ótica Hereditária de Leber (<i>Leber's hereditary optic neuropathy - LHON</i>)</p>	<p>Doença aguda, indolor, onde ocorre perda de visão. (Cwerman-Thibault et al. 2014)</p>	<p>- <i>ND1</i> (G3460A); <i>ND4</i> (G11778A) e <i>ND6</i> (T14484C) (<i>Complexo I</i>) - <i>ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6</i> (<i>Complexo I</i>) - <i>Citb</i> (<i>Complexo III</i>) - <i>COX3</i> (<i>Complexo IV</i>) (Cwerman-Thibault et al. 2014)</p>
<p>Encefalomiopatia Mitocondrial, Acidose Láctica e episódios tipo AVC (<i>Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes - MELAS</i>)</p>	<p>Enxaquecas, convulsões, epilepsia, acidose láctica, miopatia, vômitos, neuropatias, perda de visão cortical, ataxia. (Chatterjee et al. 2006)</p>	<p>-tRNA^{Leu}, tRNA^{Gln}, tRNA^{His}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Ser} - <i>ND1, ND5</i> e <i>ND6</i> (<i>Complexo I</i>) (Cwerman-Thibault et al. 2011)</p>
<p>Epilepsia mioclônica e Fibras Vermelhas Rasgadas (<i>Myoclonic epilepsy and ragged-red-fiber - MERRF</i>)</p>	<p>Epilepsia, ataxia cerebral, atrofia ótica, mental, muscular, surdez, demência. (Cwerman-Thibault et al. 2011; Tuppen et al. 2010)</p>	<p>- tRNA^{Phe}, tRNA^{His}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Ser} - <i>ND5</i> (<i>Complexo I</i>) (Cwerman-Thibault et al. 2011)</p>
<p>Síndrome de Leigh (<i>Leigh syndrome - LS</i>)</p>	<p>Lesões bilaterais em gânglios basais, tálamo e tronco encefálico. (Han et al. 2014)</p>	<p>-tRNA^{Leu}, tRNA^{Val}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Lys} -<i>ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6</i> (<i>Complexo I</i>) -<i>COX3</i> (<i>Complexo IV</i>). (Cwerman-Thibault et al. 2011)</p>



2. Terapia génica não-viral

O conceito de terapia génica, aliando-se à tecnologia do DNA recombinante, apareceu como uma boa alternativa no tratamento e prevenção de doenças de ordem genética através da introdução de um gene terapêutico (Sangro, Herraiz & Pioto 2003). O conhecimento do genoma humano também possibilita a identificação e correção dos genes que originam as patologias (Pack et al. 2005).

A primeira ideia de terapia génica apareceu em 1963, quando Joshua Lederberg referenciou que a nova Era da biologia molecular passaria pela manipulação e controlo de sequências de nucleótidos em cromossomas humanos, simultaneamente com o reconhecimento dos genes desejados (Edelstein et al. 2004).

O sucesso da terapia génica dependerá do desenvolvimento de um vetor adequado que possa entregar o gene de interesse nas células alvo, repondo as funcionalidades do gene correspondente, para que desta forma ocorra a produção de uma dada proteína com fim terapêutico (Li & Huang 2000).

Desta forma, um sistema propício à terapia de genes deve satisfazer determinados critérios, tais como: entregar o gene a determinados tipos de célula; ser seguro, ou seja, ter baixa capacidade de resposta imunológica; ser resistente ao ambiente enzimático dentro da célula; ter baixa toxicidade e expressar o gene em tempo adequado (Mehier-Humbert & Guy 2005).

Atualmente são considerados dois tipos de sistemas para a entrega de material genético na célula: Vetores virais e Vetores não-virais.

Nos primeiros, a transferência de genes mediada por vírus é altamente eficiente, pois os vetores conseguem reconhecer e entrar na célula eucariótica expressando os seus genes. Os vetores virais são manipulados geneticamente, sendo os genes patogénicos substituídos pelo gene terapêutico de modo a reduzir a sua virulência (Bouard et al. 2009), mas as suas proteínas estruturais não patogénicas são mantidas de forma a facilitar a replicação (Kay et al. 2001).

Contudo, apresentam algumas limitações, tais como: segurança, imunogenicidade, limite no tamanho do gene e o seu elevado custo de produção (Al-Dosari & Gao 2009).

Para ultrapassar estas dificuldades dos vetores virais, o desenvolvimento de sistemas alternativos tem sido cada vez mais procurada para o sucesso da terapia génica. Na verdade, os vetores não-virais oferecem propriedades únicas que os tornam singulares no transporte de DNA.

Estes são menos patogénicos, apresentam toxicidade reduzida, são mais fáceis de produzir a baixo custo, permitem uma administração repetida sem desencadear respostas inflamatórias e não apresentam limite de tamanho na entrega de genes (Munier et al. 2005); (Sangro, Herraiz & Prieto 2003; Read et al. 2005). No entanto, apresentam como desvantagem a baixa eficácia de transfeção (Kamimura et al. 2011).

A exploração de novos sistemas à escala nano visa a formulação de vetores com propriedades melhoradas, tornando-os mais promissores na transfeção de células.

Neste projeto, a ideia de manipulação de vetores virais é posta de lado, visto que eles não têm capacidade de transfetar a mitocôndria. Assim, foi dado ênfase ao desenvolvimento de um vetor não viral baseado em DNA plasmídico (pDNA) para aplicação em terapia génica mitocondrial.

2.1. Terapia génica mitocondrial

A grande variabilidade de desordens mitocondriais exige, atualmente, uma grande aplicação de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças.

A compreensão das bases moleculares responsáveis pelas disfunções mitocondriais, etiologia e patologia é necessária para o sucesso de qualquer estratégia terapêutica do transtorno mitocondrial (Adhya et al. 2011).

Ainda que doenças mitocondriais possam ser causadas por mutações a nível nuclear como a nível mitocondrial, é necessário a introdução de um sistema que complemente as disfuncionalidades do organelo (Doyle & Chan 2008).

À luz disto, o desenvolvimento de protocolos de terapia génica aplicados à mitocôndria torna-se um assunto promissor de forma a contornar enfermidades indesejáveis. Apesar de ainda serem poucos os estudos sobre este tema, há que salientar algumas estratégias de terapia génica mitocondrial até agora desenvolvidas.

O desenvolvimento de um nano transportador DF-MITO-Porter pretende juntar duas estratégias para melhorar a eficiência de internalização na célula através de octoarginina (R8) e também através das interações electroestáticas que permitem a fusão com a mitocôndria (Yamada et al. 2011).

Outras abordagens demonstraram, em estudos *in vitro*, que DQAsomes têm a capacidade de condensar o plasmídeo, protegê-lo das DNases, migrar e localizar-se na mitocôndria (Weissing et al. 1998).

2.2. Nanopartículas

Hoje em dia, a principal finalidade da nano biotecnologia é criar um transportador capaz de libertar agentes bioativos ou fármacos de forma segura, eficaz e controlada. Para serem usados de forma terapêutica, estes têm de proteger a carga genética da degradação enzimática, não apresentar qualquer toxicidade ou efeitos secundários e têm de libertar não só o fármaco num período de tempo específico como também alcançar o compartimento intracelular desejado (Gullotti & Yeo 2009; Vercauteren et al. 2012).

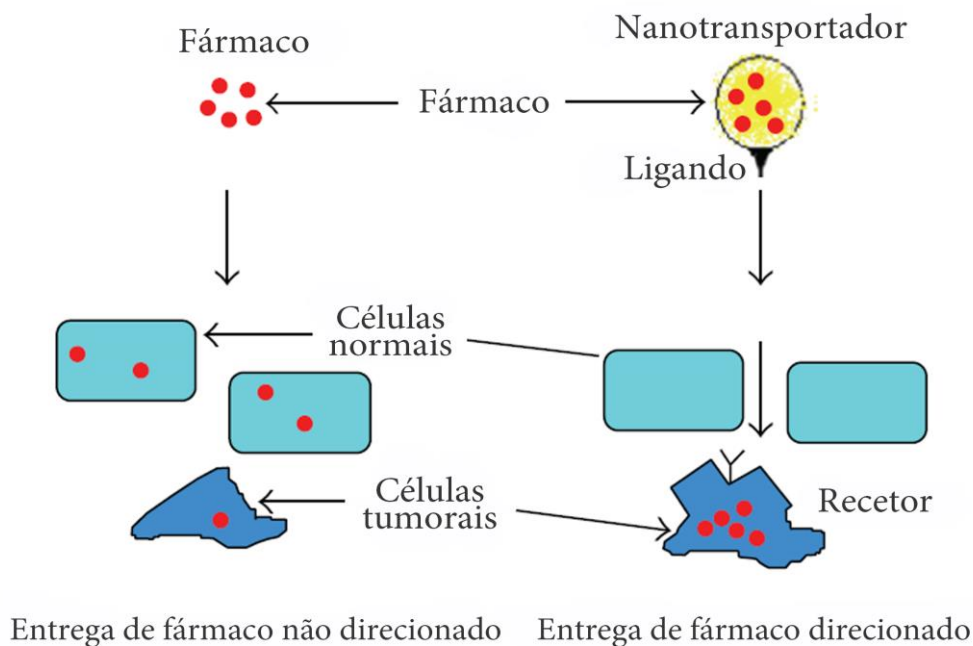


Figura 5- Representação esquemática de sistemas de transporte para a entrega de fármaco em células alvo. (*adaptado de Qiao et al. 2010*).

A ideia de direcionar um fármaco para um local específico implica modificar as propriedades físico-químicas do transportador. A alteração da superfície do sistema de transporte permite melhorar as suas características biológicas de forma a controlar, por exemplo, a sua estabilidade, tamanho e tempo de meia vida (Torchilin 2012). A formação de complexos entre polímeros catiónicos e DNA ajuda não só na estabilidade da nanopartícula devido à interação electrostática das cargas negativas do grupo fosfato da molécula de DNA com as cargas positivas dos grupos amins do polímero, como também a ultrapassar a barreira de cargas negativas presentes na membrana celular. Exemplo desses casos são nanopartículas formuladas à base de polímeros como o quitosano (Gaspar et al. 2011) e polietilenamina (Pereira et al. 2012).

Para além de polímeros catiónicos, outro tipo de materiais como microgeis (Costa et al. 2012) e derivados de cálcio (Ueno et al. 2005) são utilizados como sistemas de entrega para terapia génica.

O sistema de transporte proposto nesta dissertação é à base de materiais inorgânicos, como o carbonato de cálcio. Este tipo de sistema não se torna desconhecido por parte da nossa equipa de investigação, sendo uma abordagem adequada à terapia génica mitocondrial, que tem vindo a apresentar resultados satisfatórios (Santos et al. 2014); (Salvado et al. 2015).

Nano sistemas à base de carbonato de cálcio podem ser usados como sistema de entrega devido à elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade, vasto recurso e baixo custo (Xu et al. 2012). Em contrapartida, a formação dos precipitados pelo método de co

precipitação não é controlada devido à formação de partículas de pequenas e de grandes dimensões, sendo desfavorável para a internalização celular. Em alternativa, uma forma de se controlar o tamanho das partículas é através de adição de um polímero catiónico que melhora a estabilidade das nanopartículas, reduzindo o tamanho e promovendo assim a transfeção celular (Zhao et al. 2012).

Após a transfeção celular, a visualização das nanopartículas no interior das células torna-se possível com a adição de sondas ou corantes fluorescentes. O uso de sondas fluorescentes tem como objetivo a visualização de um determinado compartimento intracelular para posteriores estudos sobre a estrutura e funcionamento de processos celulares (Cruz et al. 2011). Compostos macro-ciclos fluorescentes derivados de fenantrolina e catiões poliamina demonstraram ter afinidade com a mitocôndria (Cruz et al. 2011).

Para estudar a distribuição sub-celular dos compostos é necessário ter em conta os aspetos estruturais desses mesmos. Características como aromaticidade, a presença de amins secundárias ou terciárias e a própria carga do composto podem ser fatores determinantes na localização e além disso é necessário ter em conta os efeitos sobre a morte celular que podem estar relacionados com a presença do composto fluorescente.

Com o intuito de progredir nesta metodologia, sintetizaram-se compostos derivados de acridina, naftaleno e quinolina fluorescentes que teve por base o mesmo princípio de afinidade com a mitocôndria.

Assim, foi desenvolvida uma formulação à escala manométrica que inclui o revestimento de precipitados de sais e pDNA com derivados de acridina, naftaleno e quinolina sintetizados. As nanopartículas resultantes deste processo foram devidamente caracterizadas, por um conjunto variado de técnicas experimentais, demonstrando viabilidade para uso em protocolos de terapia génica.

3. Objetivos do trabalho

Como se sabe, o DNA mitocondrial está sujeito a várias mutações devido à proximidade das espécies reativas oxidativas originadas pelo complexo respiratório e como tal, estão relacionadas com inúmeras citopatias que podem influenciar o funcionamento de qualquer célula ou tecido que requer elevado consumo de energia. Por isso, o desenvolvimento de novas metodologias para a terapia génica mitocondrial tem sido bastante estudado pelo nosso grupo de investigação.

A terapia génica mitocondrial é considerada uma abordagem potencialmente promissora e aliciante, uma vez que possibilita a introdução de ácidos nucleicos como alvo terapêutico em células vivas para o tratamento de doenças em questão.

Seguindo esta abordagem, o foco da presente dissertação consistiu na síntese de novos compostos fluorescentes para formulação de nanopartículas à base de pDNA, sua caracterização e avaliação da viabilidade como vetor para terapia génica mitocondrial.

Desta forma, os objetivos específicos do trabalho são:

- Sintetizar compostos fluorescentes, derivados de acridina, naftaleno e quinolina com cadeias poliaminas de diferentes tamanhos;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos fluorescentes;
- Desenvolver sistemas de nanopartículas à base de carbonato de cálcio através do método de co precipitação incorporando os compostos fluorescentes e revestimento da nanopartícula com polímeros catiónicos, tais como a celulose e a gelatina;
- Avaliar a morfologia, a capacidade de encapsulamento, a proteção, a degradação, o tamanho e o potencial Zeta das nanopartículas sintetizadas.



4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes

A acridina, 97%; naftaleno-1-carbaldeído, 95%; tris(2-aminoetil)amina (tren) 96% foram adquiridos à Sigma Aldrich. O 2-bromometil etil éter 90%; 2-quinolinecarboxaldeído 97%; a dietilenotriamina 97%; a trietilenotetramina 60%; a tripropilenotetramina 97%; cloreto de *p*-toluenossulfonila; borohidreto de sódio 99% foram adquiridos à Acros Organics. O ácido acético e o carbonato de potássio foram adquiridos ao ChemLab. À Fisher Chemical foram adquiridos os seguintes solventes: acetoneitrilo, ácido bromídrico, clorofórmio, tetrahidrofurano, piridina. O sulfato de sódio anidro foi obtido à Applichem Panreac, o hidróxido de sódio e o ácido sulfúrico e o fenol à VWR Chemicals. O ácido Clorídrico 37% foi obtido à Panreac Química SAU

O meio *LB* foi obtido à Liofilchem (Roseto degli Abruzzo, Itália) e *LB-ágar* foi obtido a partir de Pronadisa/Conda (Madrid, Sapin). Extrato de levedura foi adquirido à Himedia (Bombaim, Índia) e a triptona à Biokar (França). O glicerol foi obtido à VWR International (Radnor, PA, EUA). KH_2PO_4 foi adquirido à Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica) e K_2PO_4 foram obtidos a partir de Panreac (Barcelona, Espanha). A celulose, o cloreto de cálcio anidro, o carbonato de cálcio anidro e o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram obtidos à Aldrich Chemical Company e a gelatina à Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A agarose e Green Safe foram obtidos à NZTech (Lisboa, Portugal).

4.2. Equipamentos

Para a síntese dos compostos foram utilizados os seguintes equipamentos: placas de aquecimento, Lab-Mix 25 (Heidolph, Fisher, Alemanha) acoplados com sensores de temperatura, EKT Hei-Com (Heidolph, Fisher, Alemanha). A evaporação dos solventes orgânicos foi efetuada em evaporadores rotativos da marca Büchi (Labortechnik AG, Suíça). A secagem dos compostos foi obtida na estufa de vácuo de marca Trade Raypa® (Barcelona, Espanha).

Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrómetros Bruker Avance III 400 MHz e Bruker Avance III 600 MHz (Bruker BioSpin, Alemanha). Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio (CDCl_3), água (D_2O) e a referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

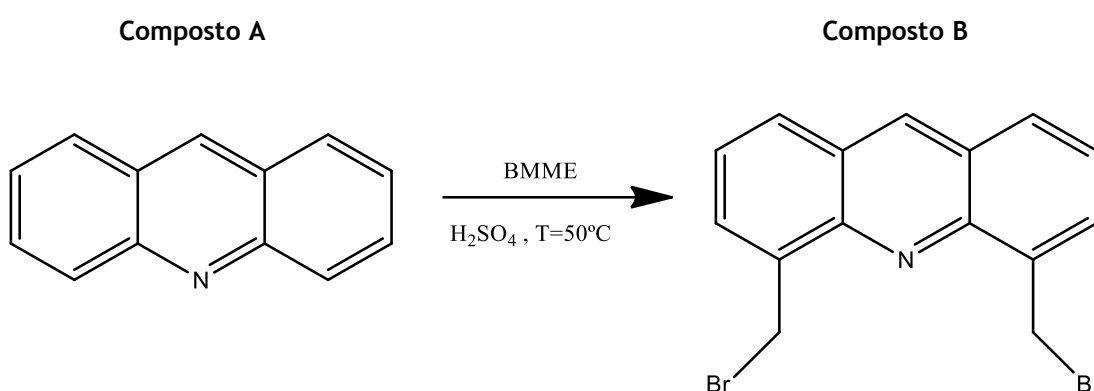
Para a fermentação foi utilizado o agitador orbital Agitorb 200 (Aralab, Portugal) e a centrífuga Allegra® X-22 (Beckman Coulter, USA) para a obtenção de *pellets*. Para a lise alcalina foi utilizado o Vortex MIXER 230 V (Labnet, Edison, NJ USA) e a centrífuga Allegra™ 25R (Beckman Coulter).

4.3. Métodos

4.3.1. Síntese dos compostos- Procedimento Experimental:

4.3.1.1. Síntese do composto 4,5-di(bromometiletil)acridina (Composto B) (Carole et al. 2005).

Esquema 1 - Esquema geral da reação da acridina com 2-bromometil etil éter.



A um balão de 2 tubuladuras, já em atmosfera inerte (N_2), foi adicionado 2g de 4,5-di(bromometiletil)acridina (Composto A) e 25mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A mistura foi mantida em agitação a $50^\circ C$. Após a estabilização da temperatura e com auxílio de uma seringa foi adicionado de uma só vez 3,971mL de 2-bromometil etil éter. A reação foi mantida nas mesmas condições de temperatura e agitação durante 12h.

Após o término da reação, o balão foi arrefecido à temperatura ambiente e seguidamente submerso em gelo durante 1h.

A não formação de precipitado implicou posteriores alterações no *work-up* (procedimento pela qual permite isolar e purificar produtos de uma reação química). Deste modo, adicionou-se de forma cuidada e gota-a-gota uma solução saturada de NaOH para a formação do precipitado. Posteriormente, efetuou-se a uma extração líquido-líquido com dois solventes imiscíveis, clorofórmio (50mL) e água destilada. Este processo foi repetido 4 vezes.

A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, obtendo-se um produto amarelo que foi seco na estufa de sólidos.

MS (ES+): m/z calculada para $C_{15}H_{11}Br_2N$ é de 365,06, foi encontrado a 210,09 [M + H]⁺.

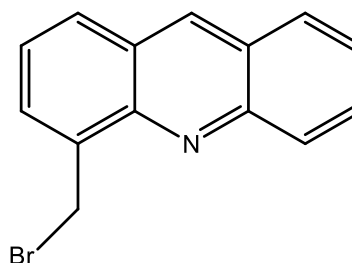
Através da análise por microscopia de massa e RMN, verificou-se apenas que o composto estava mono substituído (composto C). Foi também notório a presença de um outro composto: acridinamono(hidroximetil). O rendimento da reação foi de 49,23% ($m_{\text{final}} = 1,9\text{g}$)

Caracterização do Composto C:

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 5,36 (s, 2H, CH₂); 7,44 (m, 1H, 3CH); 7,87 (d, 1H, CH); 7,928 (d, 1H, 2CH); 8,141 (m, 2H, CH); 8,7 (s, 1H, CH).

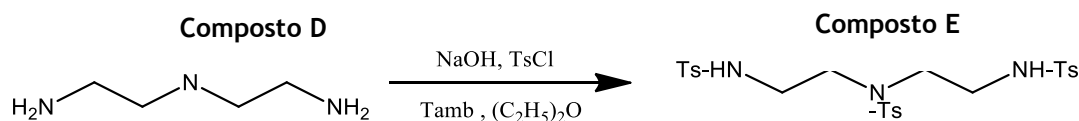
¹³C RMN (600MHz, CDCl₃): δ 29,109; 121,1; 124,8; 124,813; 125; 125,786; 127,47; 128,01; 128,2; 128,9; 129,9; 130,1; 135,47; 144,74.

Composto C



4.3.1.2. Tosilação da dietilenotriamina (Composto E) (Bencini et al. 1987).

Esquema 2- Esquema geral da reação de tosilatação da dietilenotriamina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila



Num balão de 500mL, em agitação e à temperatura ambiente, foram dissolvidos 15g de NaOH em 100ml de água destilada e posteriormente adicionou-se 8g de dietilenotriamina (Composto D), fazendo a solução 1.

Foram dissolvidas 50g de cloreto de *p*-toluenossulfonila (TsCl) em 250mL de éter etílico formando a solução 2.

A solução 2 foi adicionada gota-a-gota à solução 1 durante 3h, sob vigorosa agitação e sob gelo. De seguida a reação foi deixada à temperatura ambiente durante a noite.

O produto obtido foi filtrado, lavado com água, etanol, éter etílico e recristalizado com uma mistura de metanol e clorofórmio a quente. O produto foi seco na estufa. O rendimento da reação foi de 30,83% ($m_{\text{final}} = 10\text{g}$).

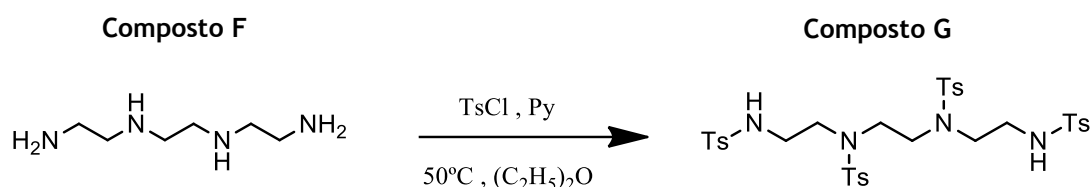
Caracterização do composto E:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 2,42 (s, 9H, CH_3); 3,13(d, 4H, 2CH_2); 3,17(d,4H, 2CH_2)

^{13}C RMN (400MHz, CDCl_3): δ 21,59; 42,6; 50,55; 134,62; 136,65; 143,63; 144,21.

4.3.1.3. Tosilação da trietilenotetramina (Composto G) (Bencini et al. 1987).

Esquema 3- Esquema geral da reação de tosilção da trietilenotriamina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila.



Num balão de 2 tubuladuras foi dissolvido 5g cloreto de *p*-toluenossulfonila (TsCl) em 10mL de éter etílico a 50°C sob agitação. Após a estabilização da temperatura, foi adicionada a 1g de trietilenotetramina (Composto F) dissolvida em 5mL de piridina. A reação foi mantida durante 2h. No final das 2h de reação, o balão foi arrefecido à temperatura ambiente e posteriormente adicionado uma solução de 10mL de HCl a 1M para neutralizar a piridina. O produto resultante foi filtrado, lavado com água, etanol e dissolvido em clorofórmio. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com uma solução de 50mL de HCl a 1M, 3 vezes com água destilada e por fim seca com sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada, o solvente evaporado e o produto final seco na estufa de sólidos. O rendimento do produto foi de 12% ($m_{\text{final}} = 627\text{mg}$).

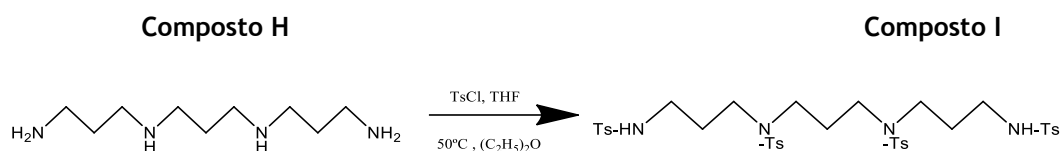
Caracterização do Composto G:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 2,348 (s, 6H, 2CH_3); 2,374 (s, 6H, 2CH_3); 3,092 (m, 4H, 2CH_2); 3,15 (m, 4H, 2CH_2); 3,345 (s, 4H, 2CH_2); 7,256 (m, 8H, 8CH); 7,673 (m, 8H, 8CH).

^{13}C RMN (400MHz, CDCl_3): δ 20,52; 20,54; 42,68; 49,83; 50,02; 126,10; 126,43; 128,84; 128,99; 133,68; 135,3; 142,68; 142,96.

4.3.1.4. Tosilação da tripropilenotetramina (Composto I) (Bencini et al. 1993)

Esquema 4- Esquema geral da reação de tosilção da tripropilenotetramina com os grupos protetores cloreto de *p*-toluenossulfonila.



Num balão de 2 tubuladuras e sob agitação, foi adicionado 1g de composto H, 0,212g de NaOH e 12,5mL de água destilada à temperatura de reação de 60°C. Após estabilização da temperatura, com uma ampola de adição, foi adicionado gota-a-gota uma solução com 4,049g de cloreto de *p*-toluenossulfonila dissolvidos em 10mL de THF.

Ao fim de 4h de reação, a mistura arrefeceu à temperatura ambiente.

Os solventes foram evaporados e de seguida foi adicionado 20mL de etanol quente para ressuspender o resíduo durante aproximadamente 5 dias. Posteriormente foi feita uma extração com diclorometano (3x 50mL). A fase orgânica foi evaporada e o produto obtido foi seco na estufa. O rendimento do produto foi de 4,96% ($m_{\text{final}} = 0,200\text{g}$).

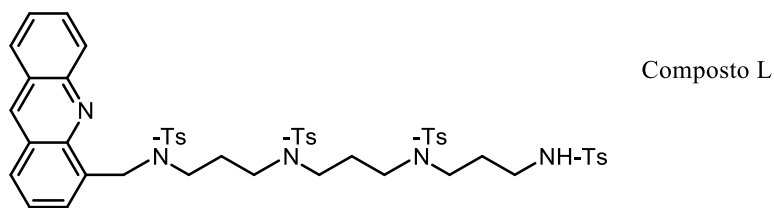
Caracterização do Composto I:

^1H RMN (400MHz, CDCl_3): δ 1,68 (m, 2H, 2CH_2); 1,75 (m, 2H, 2CH_2); 2,32 (s, 3H, 2CH_3); 2,33, (s, 3H, 2CH_3); 2,88(m, 2H, 2CH_2); 2,99 (t, 2H, 2CH_2); 3,04 (t, 2H, 2CH_2); 7,991 (m, 1H, 8CH); 7,54 (d, 1H, 4CH); 7,646 (d, 1H, 4CH)

^{13}C RMN (400MHz, CDCl_3): δ 20,48; 27,56; 28,27; 39,17; 45,41; 46,23; 125,99; 126,09; 128,86; 128,73; 134,53; 135,74; 142,35; 142,62.

4.3.1.5. Adição dos compostos E, G e I ao composto C (Bartoli et al. 2009)

Quando os solventes são referidos como secos, estes foram secos e destilados através do seguinte método: os *peneiros moleculares-4A* (“*molecular sieves*”) são ativados numa mufla durante 24h. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente cerca de 24h e de seguida foram colocados dentro de um frasco e adicionado o solvente de interesse. Este posteriormente destilado.

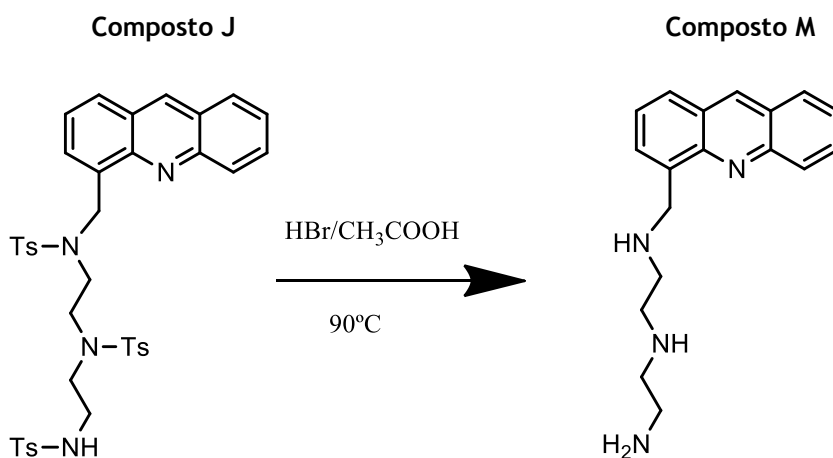


4.3.1.6. Remoção dos grupos tosilo dos compostos J; K e L (Bartoli et al. 2009)

Num balão de 250mL, o composto J (0,522g) juntamente com fenol (12,4g) foram dissolvidos numa mistura de 33% de HBr/CH₃COOH (55mL). A reação foi mantida a 90°C durante 24h sob agitação. Como não houve formação de precipitado, neutralizou-se a mistura com uma solução saturada de NaOH até pH=11. Aquando da sua adição, foram visíveis mudanças de cor, desde cor encarnada até rosa intenso.

O composto foi filtrado, lavado com clorofórmio e evaporado. O fenol foi removido com várias lavagens de etanol (70%) e filtragens.

Esquema 7- Esquema geral da remoção dos grupos protetores tosilos ao composto J.



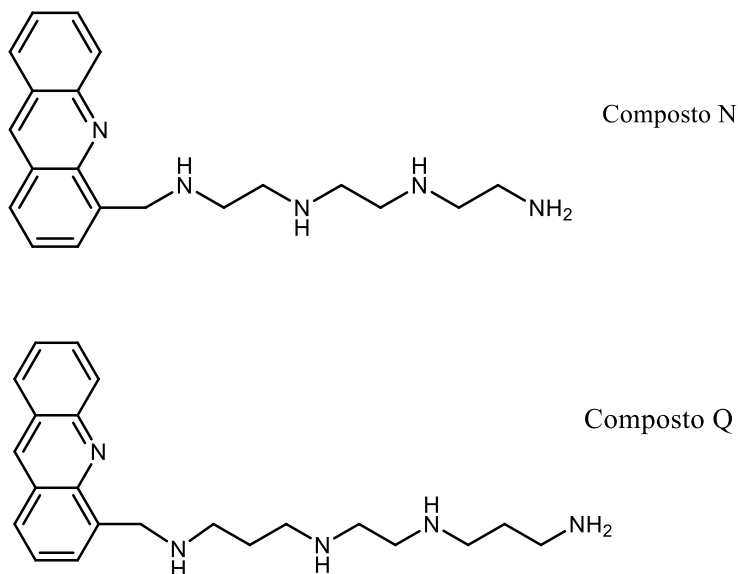
Caracterização do composto M:

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 1,655 (s, 1H, 2CH₂); 3,27 (s, 2H, CH₂); 3,49 (m, 1H, CH₂); 2,48 (s, 2H, CH₂); 6,86 (d, 1H, CH); 7,25 (d, 1H, CH); 7,45 (d, 1H, 2CH); 7,52 (d, 1H, CH); 7,49 (s, 1H, CH); 7,82 (d, 1H, CH)

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃): 20,65; 29,98; 38,59; 46,69; 20,88; 114,85; 117,339; 126,7; 126,82; 129; 130; 130,17; 132,4; 134,1; 145; 154; 154,66.

Em relação à remoção dos grupos tosilo do composto C com as aminas trietilenotetramina e tripipilenotetramina, foram efetuadas com o mesmo protocolo que está descrito no ponto 4.3.1.6.

Esquema 8- Representação esquemática dos compostos N e Q.

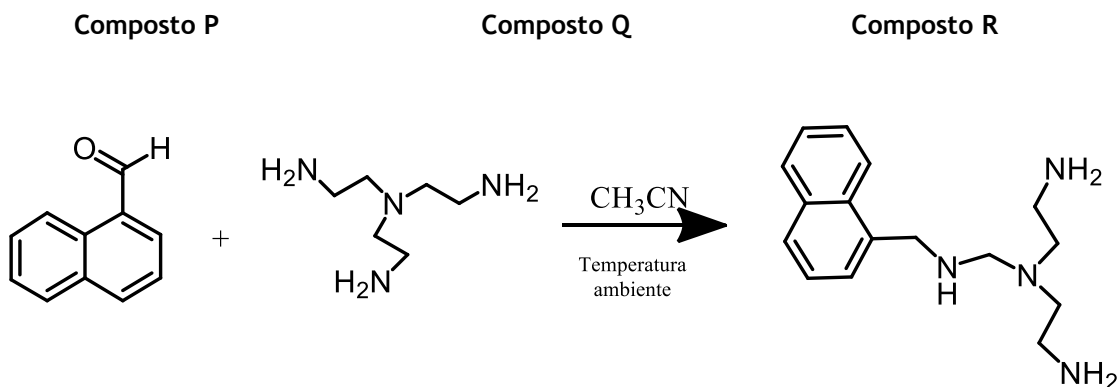


As lavagens sucessivas com etanol e água resultou à perda de composto, tornando-se apenas possível realizar análise dos compostos por espectroscopia de RMN de ^1H . Após a análise dos espectros, verificou-se que a remoção dos grupos tosilo apenas ocorreu para o Composto M.

Em alternativa, optou-se por uma nova estratégia de síntese designada por reação de condensação de um aldeído com aminas com formação da correspondente imina e posterior redução desta com borohidreto de sódio (NaBH_4).

4.3.1.7. Síntese do composto R: 1-naftaldeído e tris (2-aminoetil) amina (Clares et al. 2004)

Esquema 9- Esquema geral da tris (2-aminoetil) amina com o 1-naftaldeído.



500mg de composto S e 1,24g de composto D foram adicionadas a uma mistura de etanol-acetonitrilo (1:1) num balão de 2 tubuladuras. Após a agitação foi notória uma tonalidade laranja no interior do balão. Ao fim de 2h de reação, os solventes foram evaporados e adicionado 25mL de etanol 99% e 1,04g de borohidreto de sódio. Foi visível a mudança de tonalidade de laranja para amarelo claro.

Ao fim de aproximadamente 5h de reação à temperatura ambiente, foi feita uma filtração para remover o excesso de borohidreto e posterior evaporação do solvente. Em seguida, o composto foi tratado com água destilada e extraído com clorofórmio (3 x 50mL) utilizando uma ampola de decantação de 250mL. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O óleo apresentava uma cor amarela.

Para a formação do precipitado, foi adicionado 3mL de etanol 99%, 6mL de dioxano e gotas de ácido clorídrico a 37%, obtendo-se um precipitado cor de laranja. O rendimento da reação foi de 14,73% ($m_{\text{final}} = 0,108\text{g}$)

Caracterização do Composto T:

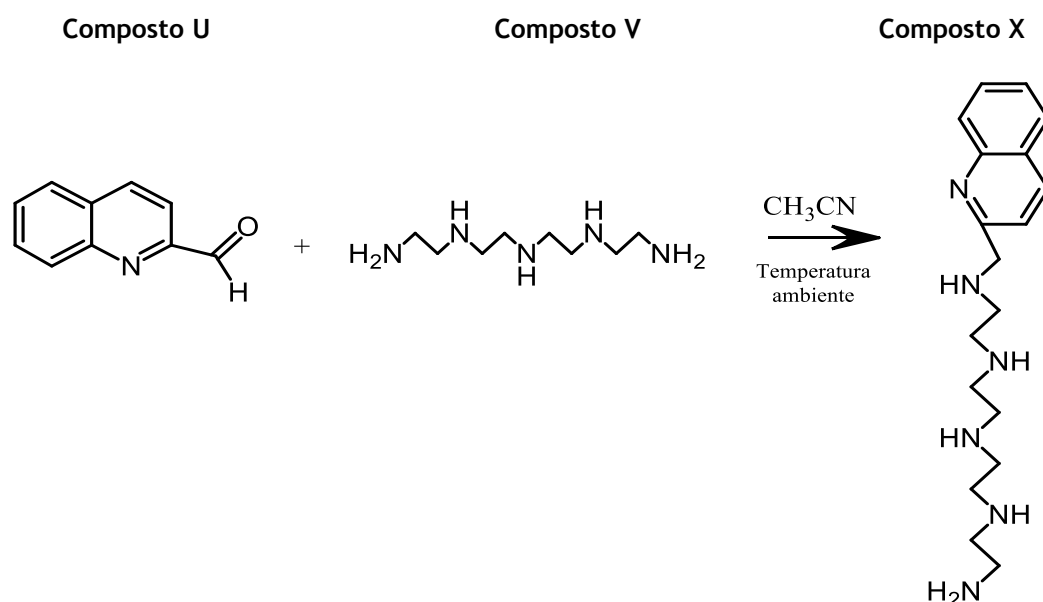
^1H RMN (D_2O , 400 MHz): 3,37 (m, 4H, 2CH_2); 3,46 (t, 2H, CH_2); 3,57 (t, 2H, CH_2); 4,67 (s, 2H, CH_2); 7,70 (d, 1H, CH); 7,73 (d, 1H, CH); 7,9 (t, 1H, CH); 8,05 (d, 1H, CH); 8,08 (d, 1H, CH); 8,66 (d, 1H, CH).

^{13}C RMN (D_2O , 400 MHz): 35,38; 43,33; 43,9; 44,5; 50,33; 120; 124,8; 128,11; 128,59; 128,8; 132,98; 142,6 143,20; 150.

4.3.1.9. Síntese do composto X: 2-quinolina carboxaldeído e tetraetilenopentamina (Clares et al. 2004)

A síntese do composto foi executado da mesma forma como está descrito no ponto 4.3.1.8.

Esquema 11- Esquema geral da tetraetilenopentamina com a 2-quinolina carboxaldeído



O cálculo do rendimento da reação indicou excesso de sal, borohidreto de sódio, não observável em RMN.

Caracterização do composto X:

¹H RMN (D₂O, 400 MHz): 2,88 (d, 2H, CH₂); 2,96 (d, 2H, CH₂); 3,09 (d, 2H, CH₂); 3,32 (d, 3H, 3CH₂); 3,41 (d, 2H, CH₂); 3,49 (d, 2H, CH₂); 4,67 (s, 2H, CH₂); 7,70 (d, 1H, CH); 7,73 (d, 1H, CH); 7,9 (t, 1H, CH); 8,05 (d, 1H, CH); 8,08 (d, 1H, CH); 8,66 (d, 1H, CH).

¹³C RMN (D₂O, 400 MHz): 35,38; 43,33; 43,9; 44,5; 50,33; 121; 125,8; 129,11; 129,59; 129,8; 133,98; 142,6 143,20; 149,2.

4.3.2. Avaliação da citotoxicidade dos compostos N, S, U e X pelo método MTT

As células, fibroblastos humanos (C-12302), designadas por *Normal Human Dermal Fibroblasts*, foram semeadas em placas de 96 poços (1x 10⁵ célula/poço) a 37° C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂, até a confluência ter sido obtida. As células foram então tratadas com 0,01 mM de composto N ou 0,01 mM de composto S ou 0,01mM de composto U ou 0,01 mM de composto X. Após a incubação durante 24, 48 e 72h, a atividade de redução foi avaliada através da redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

100µL da solução corante de MTT (0,05 mg mL⁻¹ em solução de Krebs) foi adicionada a cada poço, seguido de incubação durante 2 h nas mesmas condições.

Posteriormente, o meio foi aspirado e as células tratadas com 50mL de isopropanol/HCl (0,04 N) durante 30 minutos.

Também foi testado o efeito da concentração, seguindo o mesmo procedimento. Os fibroblastos foram tratados com cinco concentrações diferentes (0,01µM, 0,1µM, 1µM, 5µM e 10µM) de compostos durante 72h, usando como controlo as células não tratadas.

Em ambas as experiências foi medida a absorvância a 570 nm utilizando um leitor de microplacas de Referência Biorad. O espectrofotómetro foi calibrado a zero utilizando o meio de cultura sem células.

Para determinar a viabilidade celular recorreu-se à seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{Abs_{teste}}{Abs_{controlo}} \times 100$$

Todas as experiências foram repetidas três vezes em triplicado. A análise estatística dos dados experimentais foi realizada usando o teste *t-Student* e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). A significância estatística foi aceite a um nível de $p < 0,05$.

4.3.3. Preparação e purificação do plasmídeo pCAG-ND1

Um banco de 200 μ L de *E. coli* JM109 transformadas com pCAG-ND1 foram plaqueadas em placas de LB-agar (15g/L de agar, 10g/L de Triptona, 5g/L de extrato de levedura e 5g/L de NaCl) suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina e 50 μ g/mL de neomicina, o seu crescimento foi realizado a 37°C durante a noite.

A produção do plasmídeo pCAG-mtND1 foi realizada na estirpe *E. coli* JM109 em 250 ml de meio *Terrific Broth* (TB) (20g/L de triptona, 24g/L de extrato de levedura, 4mL/L de glicerol, 0,017M de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 0,072M) em 1000 mL Erlenmeyers suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina e 50 μ g/mL de neomicina a 37°C num agitador orbital a uma frequência de agitação de 250 rpm.

Após cerca de 7h de fermentação, as células foram colhidas por centrifugação durante 10 min a 4 °C e 4500 rpm numa centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter, CA, EUA).

O plasmídeo foi purificado através do *kit* NYZtech® maxiprep.

As células previamente colhidas foram resuspensas e de seguida foi realizada uma lise alcalina. Após a lise, o plasmídeo liga-se seletivamente à coluna carregada com uma resina de permuta aniónica. Após a eluição do pDNA, a precipitação é feita através do isopropanol e o pDNA é centrifugado a 15000 xg durante 20 min de por fim resuspensão em tampão TE a pH 7,5.

O rendimento de plasmídeo foi determinado por espectrofotometria a 260 nm e a sua integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Alíquotas de 500 mL de plasmídeo (100 μ g/mL) foram preparadas e armazenadas a -80°C.

4.3.4. Síntese das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas a partir de soluções iniciais de 30 mg/mL de CaCl_2 e 42,5 μ g/mL de NaCO_3 . Foram preparadas 2 soluções, solução A contendo 5 μ g de pDNA, 120 μ L de CaCl_2 , 15 μ L de composto e 112,5 μ L de água Mili-Q perfazendo um total de 290 μ L. A solução B possui 225 μ L de NaCO_3 e 5 μ L de polímero: celulose ou gelatina (1mg/mL)

A solução A foi adicionada à solução B com a ajuda de uma pipeta de Pasteur formando uma solução final de 515 μ L. As nanopartículas foram centrifugadas a 130 000 rpm durante 15 min. O *pellet* formado possui as nanopartículas CaCO_3 /pCAG-ND1/composto/polímero.

Similarmente, a uma solução de plasmídeo (A) que contem 10 µg pCAG-ND1, foi adicionado 120 µL de CaCl₂, 15 µL de composto e 55 µL de Mili-Q, perfazendo num total de 290 µL. A solução B apresenta as mesmas condições referidas acima.

4.3.5. Caracterização das Nanopartículas

4.3.5.1. Morfologia das Nanopartículas

Após a junção das soluções A e B, as nanopartículas são centrifugadas durante 15 minutos a 13000 rpm a 25°C, o sobrenadante é removido e as nanopartículas lavadas com 200 µL de água Mili-Q e novamente centrifugadas durante 10 min.

Posteriormente, o sobrenadante é descartado, e o *pellet* é ressuspensão em 40 µL de tungsténio 1%. É feita uma diluição de 1:20.

No dia seguinte, as nanopartículas são cobertas com ouro usando um Emitech K550 sputter coater (Londres, Inglaterra) e analisadas num Microscópio Eletrónico de Varrimento (SEM) (Hitachi S-3400, Tóquio, Japão) operando a uma voltagem de aceleração de 20kV com diferentes magnificações.

4.3.5.2. Eficiência de encapsulação do pDNA

Para determinar a eficiência da encapsulação, as nanopartículas foram preparadas como está descrito no ponto 4.3.4. A percentagem de eficiência de encapsulação determina a quantidade de pDNA que foi encapsulado. Para essa percentagem é necessário ter em conta o pDNA que está no sobrenadante, ou seja, o pDNA não encapsulado. Para tal, recorre-se à seguinte fórmula:

$$(\%EE) = \frac{\text{Quantidade total de pDNA} - \text{Quantidade de pDNA no sobrenadante}}{\text{Quantidade total de pDNA}} \times 100$$

A análise foi feita no espectrofotómetro *Ultrospec 3000 UV-Visible* a 260 nm. Foram obtidos triplicados e a água Mili-Q foi usada como branco.

4.3.5.3. Zeta Potencial e Tamanho das Nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas e as suas cargas superficiais (potencial zeta) foram determinados a 25°C usando um Zetasizer Nano ZS e uma célula zeta. Para a determinação do tamanho da partícula foi usada uma técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), usando um laser He-Ne 633 nm retroespalhamento ótico não invasivo. Para o potencial

zeta foi usado dispersão de luz eletroforética, uma técnica de interferometria laser patenteada chamado M3-PALS (Fase de análise de dispersão de luz)

Foi utilizado o *software Malvern Zetasizer v 6,34*. Os valores médios para o tamanho e para o potencial zeta foram calculados com os dados obtidos a partir de 3 medições e respetivos desvios-padrão, mostrados como \pm DP.

4.3.6. Teste de proteção das Nanopartículas

As nanopartículas foram resuspensas em 50 μ L de FBS (10%) + PBS (10%) a pH 7,4 por um período de 30 min a 37°C. O controlo foi também incubado mas sem a solução FBS (10%) + PBS (10%).

Após o período de incubação, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas

Foi realizado o teste da citotoxicidade para os diferentes sistemas sintetizados com o mesmo princípio descrito no ponto 4.3.2.



5. Resultados

5.1. Síntese dos compostos

A estrutura molecular dos compostos fluorescentes tem de ser tida em conta consoante o estudo a realizar. Neste caso pretende-se que os compostos M, R, T e X interajam com o pDNA e que se direcionem para a mitocôndria.

Devido à precipitação que ocorreu após a adição de ácido na síntese dos compostos, fez com que as amins ficassem protonadas, e desta forma ocorrer interações eletrostáticas com os grupos fosfatos de carga negativa do pDNA.

Por outro lado, também pode ocorrer interações por empilhamento π - π entre as bases azotadas do pDNA e os anéis aromáticos dos compostos.

O direcionamento para a mitocôndria poderá ser devido aos anéis aromáticos existente dos compostos, às amins protonadas ou à conjugação de ambos. No entanto, este estudo ainda não foi realizado no âmbito desta dissertação e poderá ser trabalho a realizar na perspetiva futura.

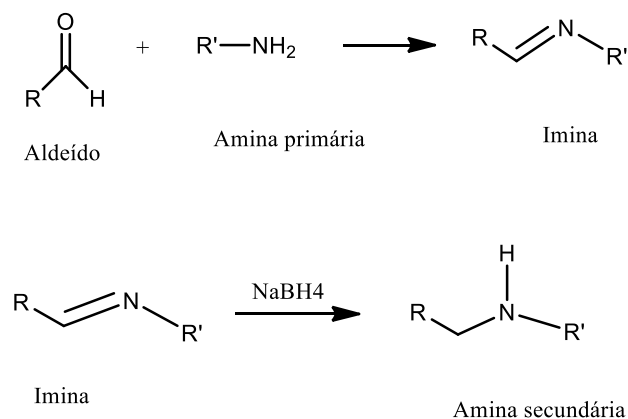
A síntese do composto C é baseado na bromometilação da acridina. Esta reação foi realizada em condições ácidas, onde o átomo de nitrogénio ao receber o protão do ácido sulfúrico promove uma deslocação da carga da nuvem eletrónica dos anéis aromáticos, deixando desprotegidos os carbonos 4 e 5. Nestas condições o BMME ataca a acridina de acordo com reação de substituição eletrofílica regioseletiva (Chiron & Galy 2003). Para esta reação obteve-se um rendimento final de 49,23%.

Como nos espectros de RMN ainda era visível um excesso de amina, utilizou-se por cromatografia de camada fina (*thin layer chromatography-TLC*) obter a mistura de solventes (metanol-diclorometano) capazes de separar o composto. Verificou-se que a mistura de solventes não foi eficiente. Posteriormente basificou-se a mistura com uma solução de NaOH e extraiu-se o composto com CHCl_3 . A remoção do sal foi feita recorrendo a sucessivas lavagens com metanol, mas mesmo assim ainda existia excesso de sal. Posto isto, este composto não foi incluído nos testes com as nanopartículas, nomeadamente o potencial zeta e o tamanho.

A estratégia de síntese baseada na adição das amins tosiladas ao composto C e a remoção dos grupos protetores tosilos só foi possível concretizar para o composto M, foi então que se optou pela realização de condensação de monoaldeídos e amins.

Os compostos R, T e X foram sintetizados numa primeira fase a partir de uma condensação de um aldeído com uma amina primária para formar uma imina. Numa segunda fase ocorreu a redução da imina com borohidreto de sódio, obtendo-se a amina secundária desejada. Os passos principais da reação de ciclo de condensação encontram-se resumidos no esquema 12.

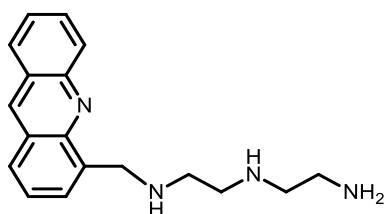
Esquema 12- Esquema geral de formação de iminas e posteriores aminas secundárias a partir de uma amina primária e aldeído.



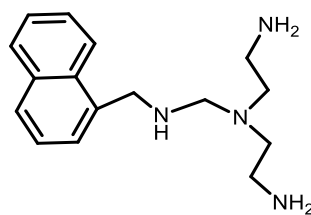
Para o composto R obteve-se um rendimento de 38,08%, para o composto T obteve-se um rendimento de 14,73% e por fim, o rendimento para o composto X não foi calculado devido ao excesso de borohidreto de sódio.

O composto M resultante de uma reação de substituição eletrofílica regioseletiva e os compostos R, T, X resultantes da reação de aminação dos aldeídos foram posteriormente estudados e os resultados são apresentados nas subseções seguintes. As suas estruturas químicas estão representados no esquema 13.

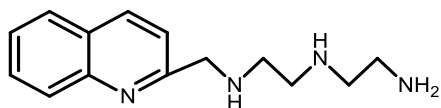
Esquema 13- Estruturas químicas dos compostos sintetizados e utilizados neste trabalho.



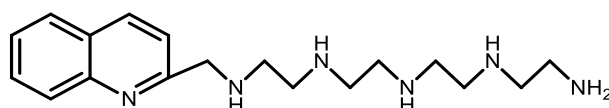
Composto M



Composto R



Composto T



Composto X

5.2. Citotoxicidade dos compostos M, R, T e X pelo método MTT

O ensaio do MTT é utilizado para determinar a viabilidade e proliferação celular, utilizando como indicador direto da citotoxicidade a apoptose. Este método avalia a atividade metabólica das células através da redução metabólica do sal de tetrazólico pelas desidrogenases associadas ao NADH e NADPH, resultando em cristais azuis de formazano no interior das células (método colorimétrico). Estes cristais são posteriormente dissolvidos em DMSO permitindo a sua quantificação por espectrofotometria. Dessa maneira, a quantidade de formazano é diretamente proporcional ao número de células viáveis. As figuras 6 e 7 mostram os resultados obtidos do ensaio MTT.

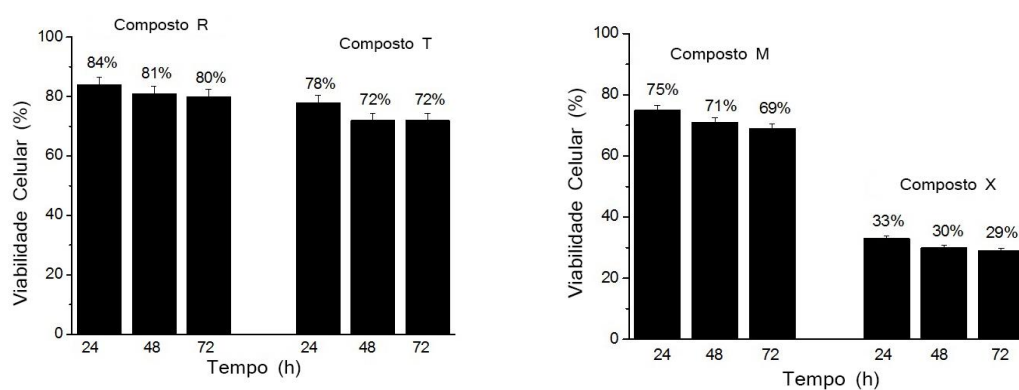
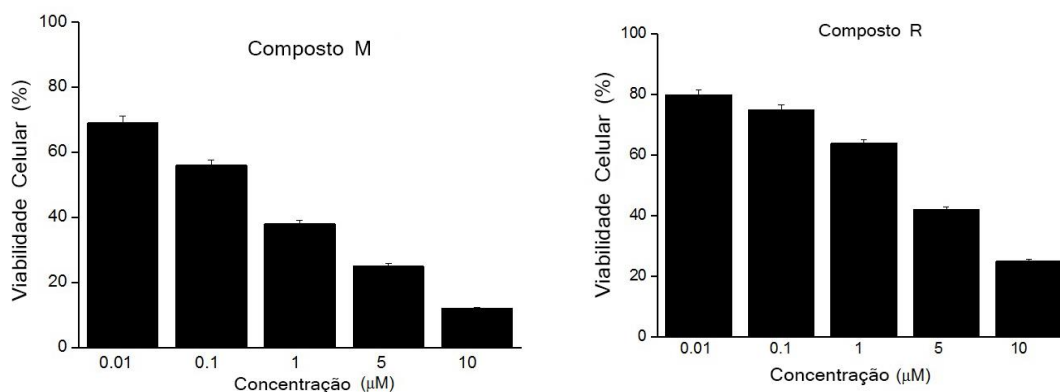


Figura 6 - Perfil da citotoxicidade para 0,01 μM de compostos R, T, M e X em fibroblastos humanos após 24, 48 e 72h de incubação, tal como medido no ensaio de MTT. As percentagens de viabilidade celular são expressas relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 0,05%. As barras de erro na figura representam os desvios padrão (isto é, $\pm\text{SD}$) das 3 experiências.



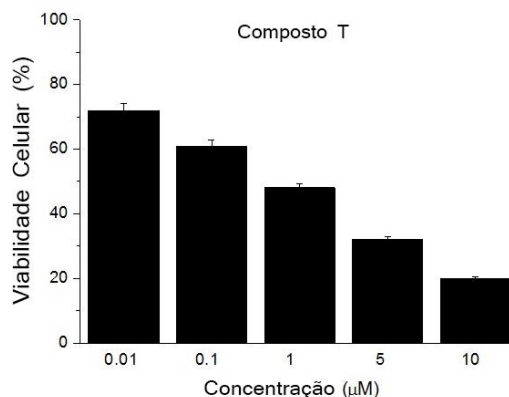


Figura 7 - Efeito do perfil da concentração dos compostos M, R e T em fibroblastos humanos após 72hde incubação. A percentagem de viabilidade é expressa relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 0,05%.

Os resultados descritos na figura 6 mostram que os compostos M, R e T não apresentam citotoxicidade celular nas horas de incubação, apesar de haver uma ligeira diminuição da percentagem da viabilidade celular ao longo do tempo. Esta ligeira diminuição não é significativa e não implica posteriores utilizações destes compostos, pois não induzem respostas inflamatórias.

Contrariamente, o composto X foi o único que apresentou uma baixa viabilidade celular, aproximadamente 30% das células. A sua elevada toxicidade é devido à presença da maior cadeia de amina. Desta forma, não foi realizado o teste das diferentes concentrações para este composto e não foram sintetizadas nanopartículas com o composto X.

Em relação à figura 7, pela análise dos resultados obtidos verifica-se para todos os compostos (M, R e T) uma diminuição da percentagem da viabilidade das células fibroblastos humanos quando há um aumento da sua concentração.

5.3. Amplificação e Purificação do Plasmídeo

O plasmídeo pCAG-ND1 foi amplificado numa cultura de células líquidas, em estirpes de *E.coli* JM109 e posteriormente purificado com um *kit* de purificação de plasmídeos da NZtech®. De seguida, o plasmídeo é analisado por eletroforese para assegurar que a isoforma superenrolada esteja presente, uma vez que é a isoforma preferencial para a terapia génica. Através da eletroforese em gel de agarose, a separação das isoformas é feita consoante o seu tamanho e conformação. Neste caso, como o número de pares de bases das isoformas é o mesmo, a separação é feita em função da conformação. O pDNA superenrolado (*sc*) é mais compacto, logo irá migrar mais facilmente através dos poros do gel de agarose. A forma circular aberta (*oc*) fica mais retida no gel devido à sua estrutura mais relaxada. Na figura 8 estão presentes as 2 isoformas

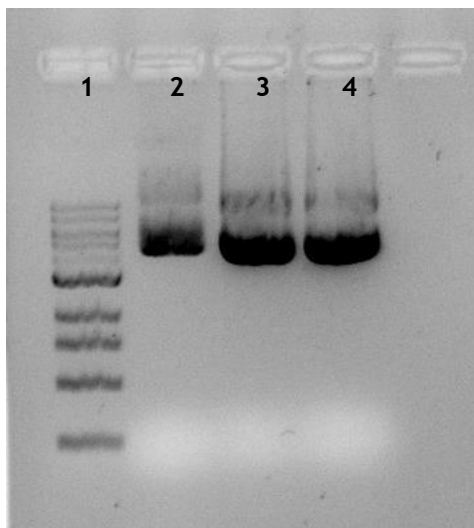
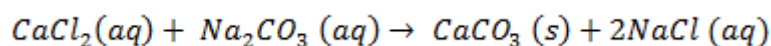
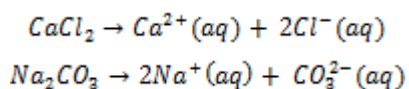


Figura 8- Eletroforese em gel de agarose do pCAG-ND1 purificado. Faixa 1-marcaador de DNA; Faixa 2- Controlo de pDNA; Faixa 3 e 4- plasmídeo purificado.

5.4. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de CaCO₃

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de co-precipitação. Este método consiste em duas soluções A e B. A solução A contém CaCl₂, pCAG-ND1 e o composto fluorescente a estudar e a solução B contém NaCO₃ e o polímero gelatina ou celulose. Após a junção da solução A com a solução B irão formar-se nanopartículas à base de pCAG-ND1/composto fluorescente/polímero.

Em solução, a molécula cloreto de cálcio (CaCl₂) dissocia-se originando iões de cálcio (Ca²⁺) e iões cloreto (Cl⁻), o mesmo acontece com a molécula carbonato de sódio (Na₂CO₃), que origina iões de sódio (2Na⁺) e um ião carbonato (CO₃²⁻). Desta forma, o ião cálcio reage com o ião carbonato, formando o carbonato de cálcio que é insolúvel em água; em simultâneo forma-se cloreto de sódio que é solúvel em água.



A celulose e a gelatina são polímeros catiónicos naturais não tóxicos, derivados de recursos renováveis, biocompatíveis, biodegradáveis e com baixa imunogenicidade tornando-se excelentes candidatos para a entrega de genes (Samal et al. 2012).

Na formação das nanopartículas, estas foram sempre protegidas da luz e antes de qualquer ensaio foram sempre mantidas em gelo para assegurar a sua preservação.

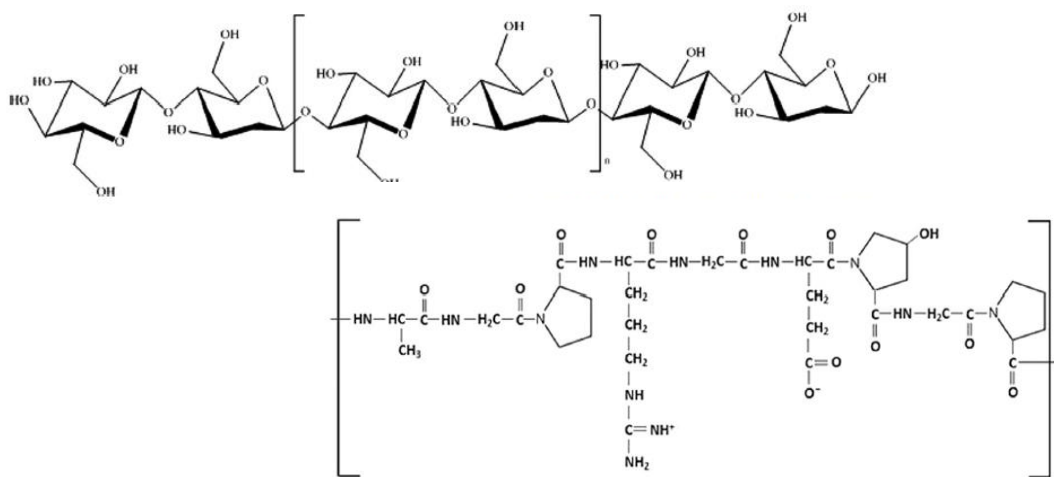
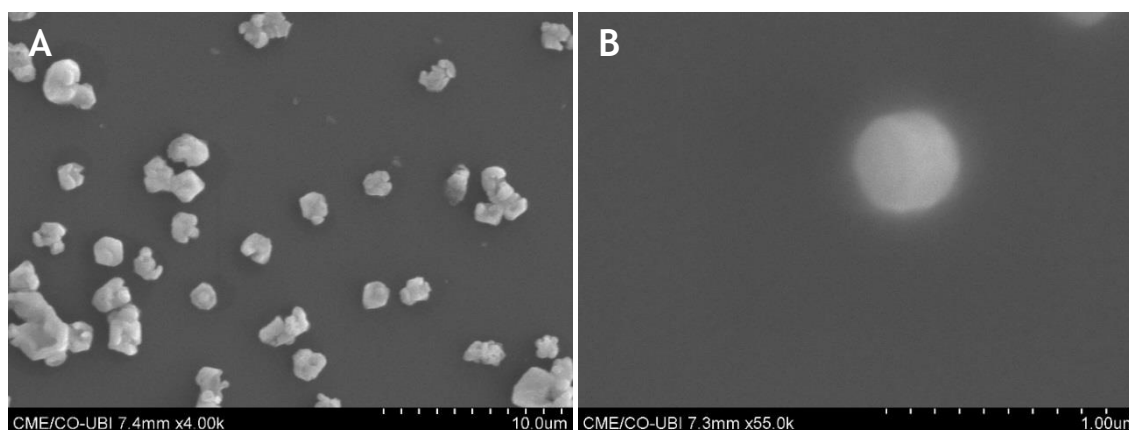
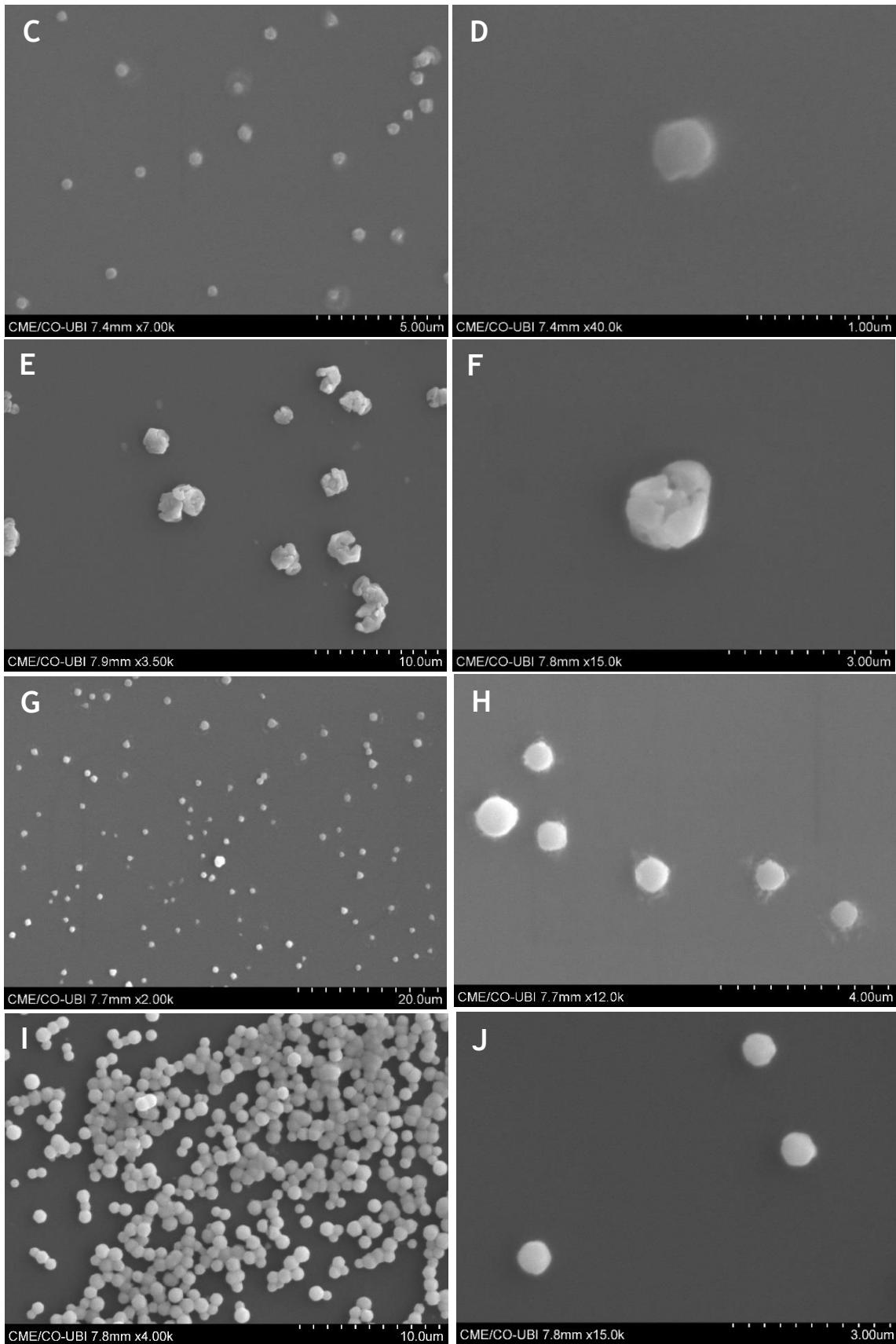


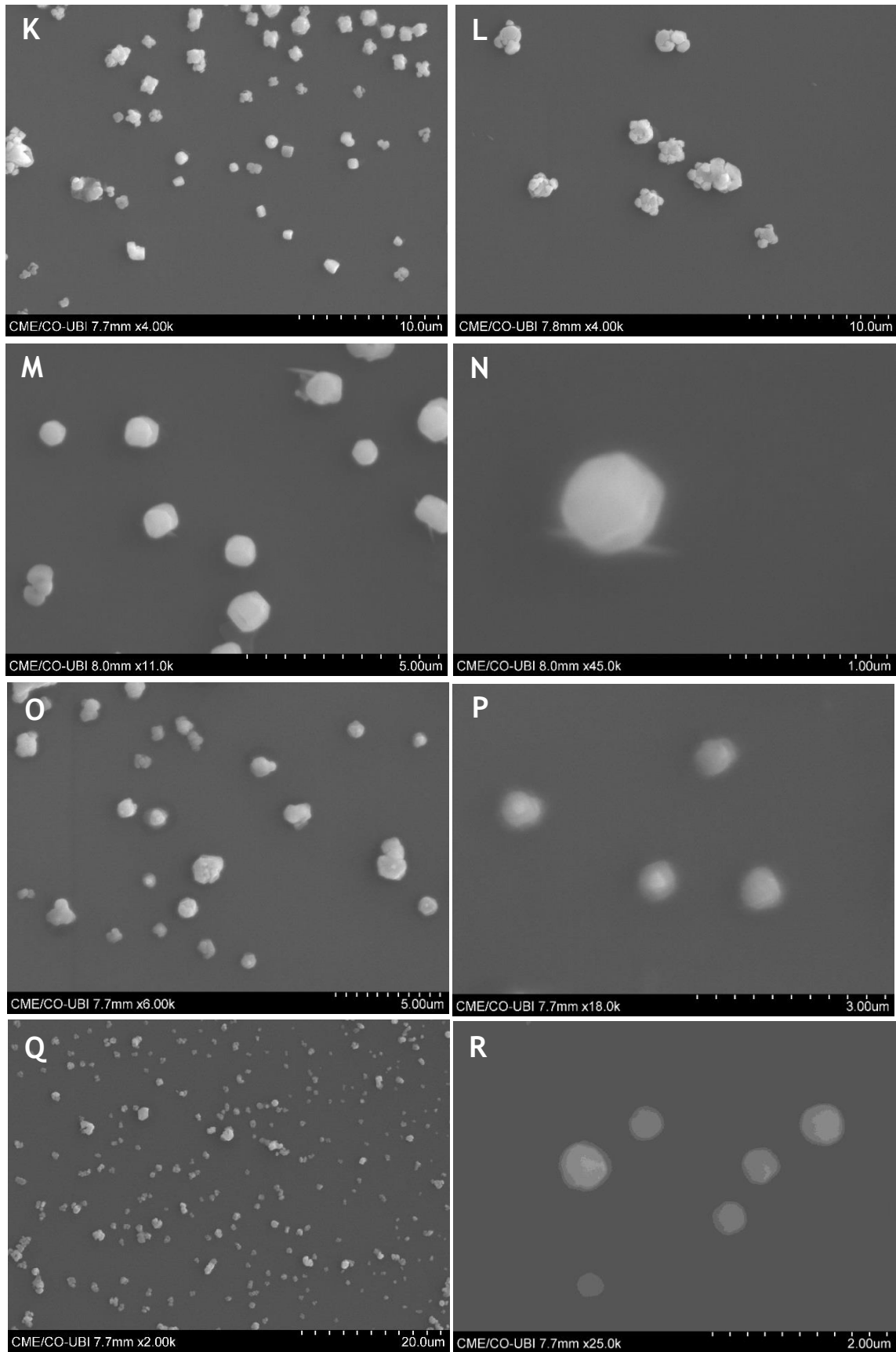
Figura 9- Estrutura molecular da celulose e gelatina, respetivamente.

5.5. Morfologia das nanopartículas

O estudo da morfologia das nanopartículas incorporadas com pCAG-ND1 foi realizado através do uso do microscópio eletrónico de varrimento - Scanning Eletron Microscopy (*SEM*). É um tipo de microscópio que usa um feixe de eletrões altamente energético para produzir informações da topografia e morfologia da amostra. Desta forma, o *SEM* permite perceber características importantes das nanopartículas, como é o caso da forma e superfície. A figura 10 apresenta imagens fornecidas pelo *SEM* para os diferentes sistemas estudados.







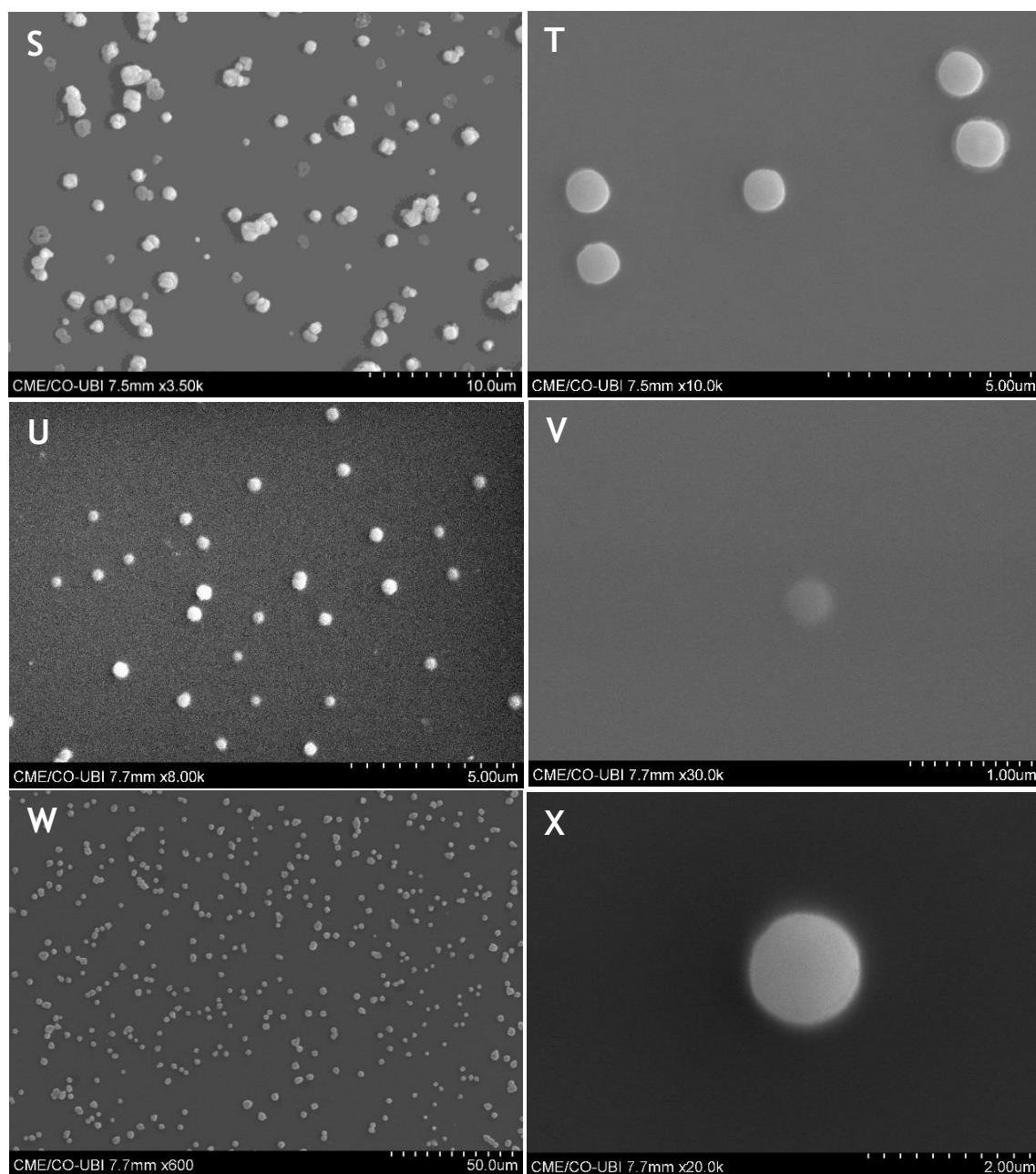


Figura 10- Morfologia das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados. Sistema 5 μ g pCAG-ND1/Composto M/celulose (A e B). Sistema 5 μ g pCAG-ND1/Composto M/gelatina (C e D). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/Composto M/celulose (E e F). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/Composto M/gelatina (G e H). Sistema 5 μ g pCAG-ND1/Composto R/celulose (I e J). Sistema 5 μ g pCAG-ND1/ Composto R/gelatina (K e L). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/Composto R/celulose. (M e N). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/Composto R/gelatina (O e P). Sistema 5 μ g pCAG-ND1/ Composto T/celulose (Q e R). Sistema 5 μ g pCAG-ND1/ Composto T/gelatina (S e T). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/Composto T/celulose. (U e V). Sistema 10 μ g pCAG-ND1/ Composto T/gelatina (W e X).

Pela visualização das imagens constata-se que as nanopartículas para os diferentes sistemas apresentam uma morfologia esférica ou oval bem definida. Esta característica torna-se importante, uma vez que a forma esférica da nanopartícula permite uma rápida absorção por parte da célula, nomeadamente ao nível da membrana celular, facilitando deste modo a posterior internalização celular.

5.6. Tamanho das nanopartículas

Uma propriedade importante de um transportador com aplicação biológica é o tamanho. O estudo do tamanho das nanopartículas incorporadas com pCAG-ND1 foi realizado usando um equipamento Zetasizer Nano ZS e uma célula zeta a 25°C. Na figura 11 são apresentados os tamanhos médios das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados.

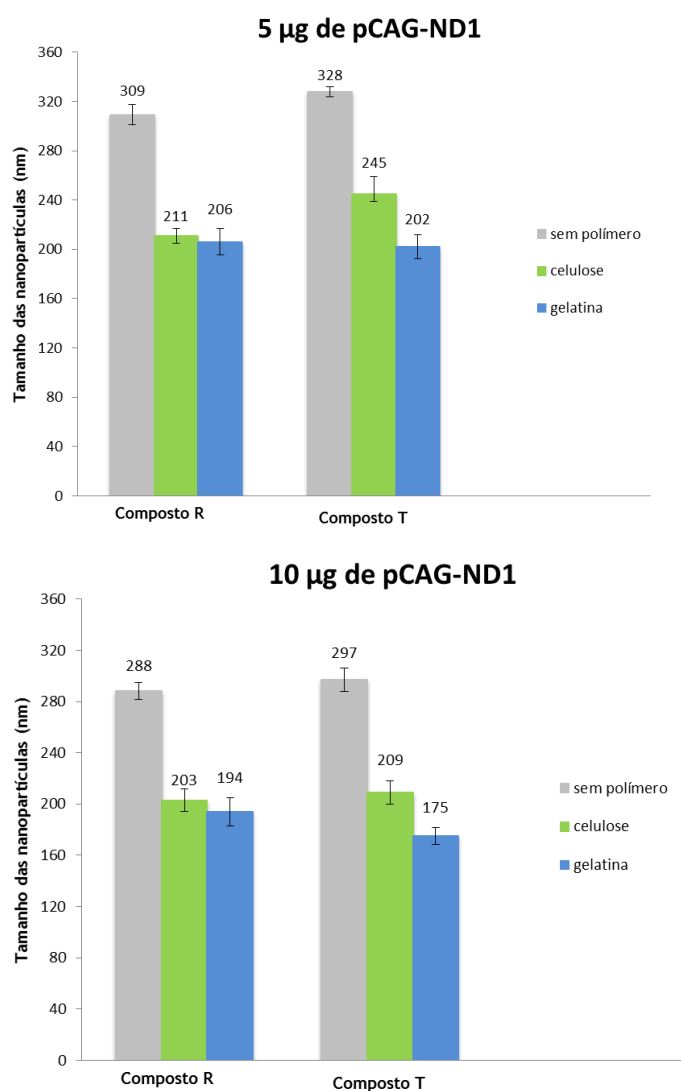


Figura 11- Tamanho da nanopartícula (nm) para os diferentes sistemas.

Foram feitas medições dos tamanhos das nanopartículas formadas. Esses valores variam entre 170 e 330 nm. Quando as nanopartículas são preparadas com polímeros (celulose e gelatina) verifica-se uma diminuição do tamanho da partícula comparativamente à preparação dos sistemas sem polímeros. A diminuição do tamanho é uma causa da interação electrostática que existe entre os grupos carboxilos do polímero com os iões Ca^{2+} formando uma estrutura mais condensada. Este facto torna-se importante pois permite uma melhor absorção celular e internalização em aplicações biomédicas práticas de entrega de genes.

O uso da gelatina conduz a valores mais baixos em relação ao tamanho comparando com a celulose, independentemente da quantidade de pDNA utilizado. Comparando os sistemas com o tipo de composto utilizado, denotam-se algumas variações no tamanho, mas não são consideradas relevantes, pois o tamanho das partículas não depende do tipo de composto estudado.

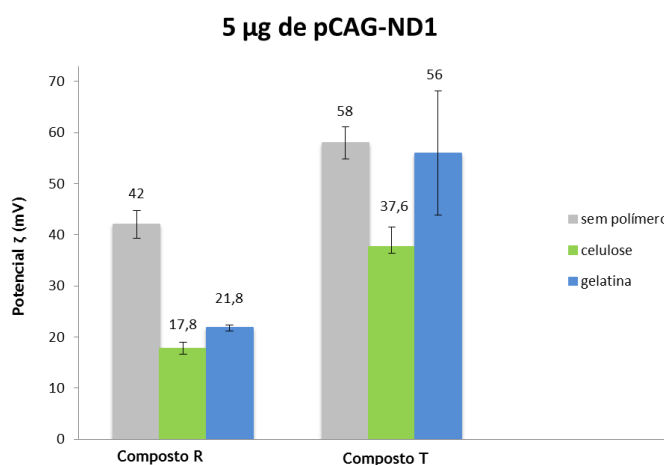
Quando comparamos os sistemas de 5 μg pCAG-ND1 e 10 μg pCAG-ND1, verifica-se que para 5 μg as nanopartículas têm um tamanho superior quando comparado com o tamanho obtido para os sistemas de 10 μg .

Em suma, todos os valores referentes ao diâmetro dos sistemas permitem o uso dos mesmos em protocolos de internalização celular.

5.7. Potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta torna-se uma particularidade importante a medir em nanopartículas devido às cargas elétricas que ocorrem quando submetidas numa suspensão líquida. A determinação do potencial zeta nanopartículas incorporadas com pCAG-ND1 foi executado no mesmo aparelho e nas mesmas condições para a determinação do tamanho.

Na figura 12 estão indicados os valores do potencial zeta para os diferentes sistemas estudados e na tabela 2 estão indicados os valores do potencial zeta para o plasmídeo, polímeros e compostos.



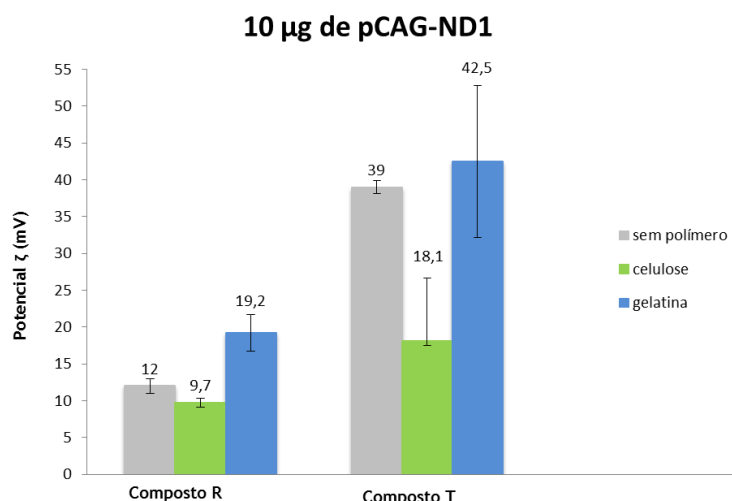


Figura 12 - Potencial ζ das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados.

Tabela 2- Medições do potencial zeta (mV) para o plasmídeo pCAG-ND1, polímeros celulose e gelatina e compostos R e T.

	Potencial zeta (mV)
pCAG-ND1	-198 ± 12,2
Celulose	-89 ± 1,4
Gelatina	+71 ± 8,9
Composto R	+40,3 ± 7,42
Composto T	+ 60,0 ± 5,99

Foram medidos os valores do potencial zeta para os sistemas pCAG-ND1/compostos/polímeros e também para o plasmídeo, compostos e polímeros isoladamente.

Na ausência de polímeros, os valores para os sistemas foram: composto R/5µg pCAG-ND1 +42 mV; composto R/10µg + 12mV; composto T/5µg +58mV e composto T/10µg +39 mV. Estes valores positivos devem-se principalmente ao facto de os compostos estarem na forma protonada.

A utilização de polímeros, para além de melhorar a estabilidade e diminuir o tamanho das nanopartículas, também favorece a interação com a carga negativa dos proteoglicanos aniónicos existentes na superfície da membrana celular, facilitando assim a internalização celular. Neste ponto, o uso de polímeros não teve qualquer influência na alteração da carga das nanopartículas, visto que tanto na presença como na ausência de polímeros, o potencial zeta manteve-se positivo.

Para o sistema 5µg de pDNA, verifica-se uma diminuição significativa do valor do potencial zeta quando se inserem polímeros. Sendo mais notória essa diminuição quando se utiliza a celulose. Esta diminuição deve-se ao facto de a celulose apresentar um potencial zeta negativo de -89mV. Para a gelatina, o potencial não sofre grande variação devido à

introdução das cargas positivas do próprio polímero e do composto T (+60mV). Para o sistema gelatina/composto R, a diminuição do potencial é devido à introdução de uma carga mais baixa por parte do composto R (+40,3mV).

Para o sistema 10 µg de pDNA, há uma diminuição do potencial zeta para a celulose, no entanto, há um aumento do potencial zeta devido às cargas positivas que se estão a introduzir com o uso da gelatina.

De uma forma geral, esta diminuição do potencial zeta para os sistemas 5µg de pDNA/celulose/compostos, 10µg de pDNA/celulose/compostos e 5 µg/gelatina/composto sugere que as nanopartículas possam estar mais aglomeradas e apresentarem uma menor estabilidade.

5.8. Eficiência de encapsulação do pDNA

Para efeitos terapêuticos, a quantidade de pDNA encapsulado e a eficiência de encapsulação são parâmetros que se devem ter em conta. A percentagem de eficiência de encapsulação (%EE) de pDNA está representada na figura 13.

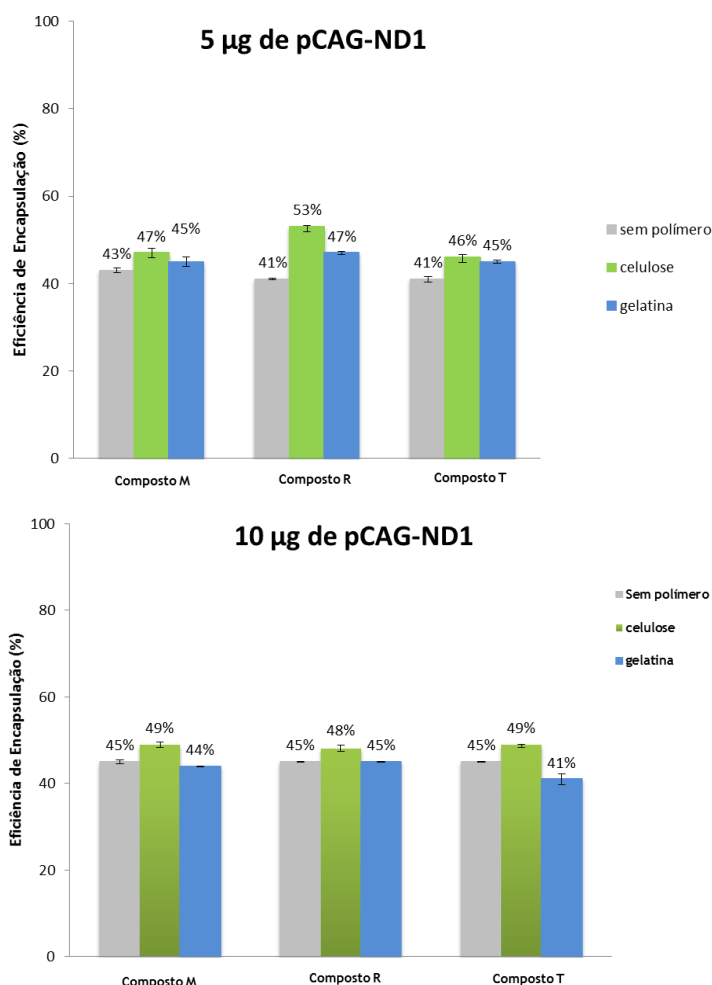


Figura 13- Percentagem de eficiência de encapsulação de pCAG-ND1 (%EE) das nanopartículas para os diferentes sistemas estudados. Todos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (SD) com n=3.

A figura 13 mostra as percentagens de eficiência de encapsulação para os nano sistemas preparados com diferentes quantidades de plasmídeo (5 e 10 μg de pCAG-ND1), polímero e compostos fluorescentes.

Para o sistema de 5 μg pCAG-ND1, a %EE aumenta quando são inseridos polímeros, para os compostos M, R e T, sendo ainda que a eficiência de encapsulação é mais notório quando se utiliza a celulose. Para o sistema 10 μg pCAG-ND1 também se verifica tal facto. A percentagem de encapsulação com a celulose é superior à da gelatina. Desta forma, pode-se dizer que a utilização de polímeros aumenta a %EE do plasmídeo devido às interações que ocorrem entre plasmídeo e polímero, porém é de realçar que os valores são mais satisfatórios quando se utiliza a celulose.

Quando se compara os sistemas 5 e 10 μg pDNA, a %EE é ligeiramente superior nos sistemas de 10 μg . Isto sugere que os protocolos desenhados para o sistema 10 μg conseguem encapsular mais quantidade de plasmídeo.

5.9. Teste de proteção das Nanopartículas

O desenvolvimento de nanopartículas estáveis ao ambiente celular é importante para a proteção do pDNA. Efetivamente, as nucleases existentes no soro são uma grande preocupação pois afetam a estabilidade do plasmídeo e conseqüente eficiência de transfeção. Deste modo, é crucial que as nanopartículas de CaCO_3 protejam o plasmídeo da degradação das nucleases. Para confirmar a capacidade de proteção das nanopartículas, estas foram incubadas com FBS (10%) + PBS (10%) a 37°C durante 30 minutos. Os resultados obtidos estão representados na figura 14.

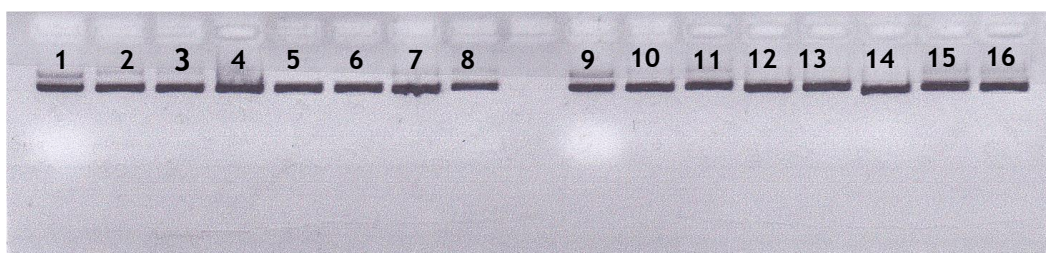


Figura 14- Eletroforese em gel de agarose 1% para os sistemas estudados incubados em FBS (10%) + PBS (10%) durante 30 min a 37 °C. Faixa 1- controlo 5 μg pCAG-ND1; Faixa 2- 5 μg pDNA/FBS+PBS; Faixa 3- Sistema 5 μg pCAG-ND1/Composto M/celulose; Faixa 4- Sistema 5 μg pCAG-ND1/Composto M/gelatina; Faixa 5- Sistema 5 μg pCAG-ND1/Composto R/celulose; Faixa 6 - Sistema 5 μg pCAG-ND1/Composto R/gelatina; Faixa 7- Sistema 5 μg pCAG-ND1/ Composto T/celulose; Faixa 8-Sistema 5 μg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina; Faixa 9- controlo 10 μg de pCAG-ND1; Faixa 10- 10 μg pDNA/FBS+PBS; Faixa 11- Sistema 10 μg pCAG-ND1/Composto M/celulose; Faixa 12- Sistema 10 μg pCAG-ND1/Composto M/gelatina; Faixa 13- Sistema 10 μg pCAG-ND1/Composto R/celulose; Faixa 14- Sistema 10 μg pCAG-ND1/Composto R/gelatina; Faixa 15- Sistema 10 μg pCAG-ND1/Composto T/celulose; Faixa 16- Sistema 10 μg pCAG-ND1/ Composto T/gelatina.

Os resultados da figura 14, verifica-se que o pDNA manteve-se estável quando incubado com FBS + PBS a 10%. Assim, podemos concluir que as nanopartículas sintetizadas à base de carbonato de cálcio e de polímeros oferecem proteção à carga terapêutica. Esta proteção deve-se principalmente à interação do pDNA com os polímeros.

5.10. Avaliação da citotoxicidade das Nanopartículas

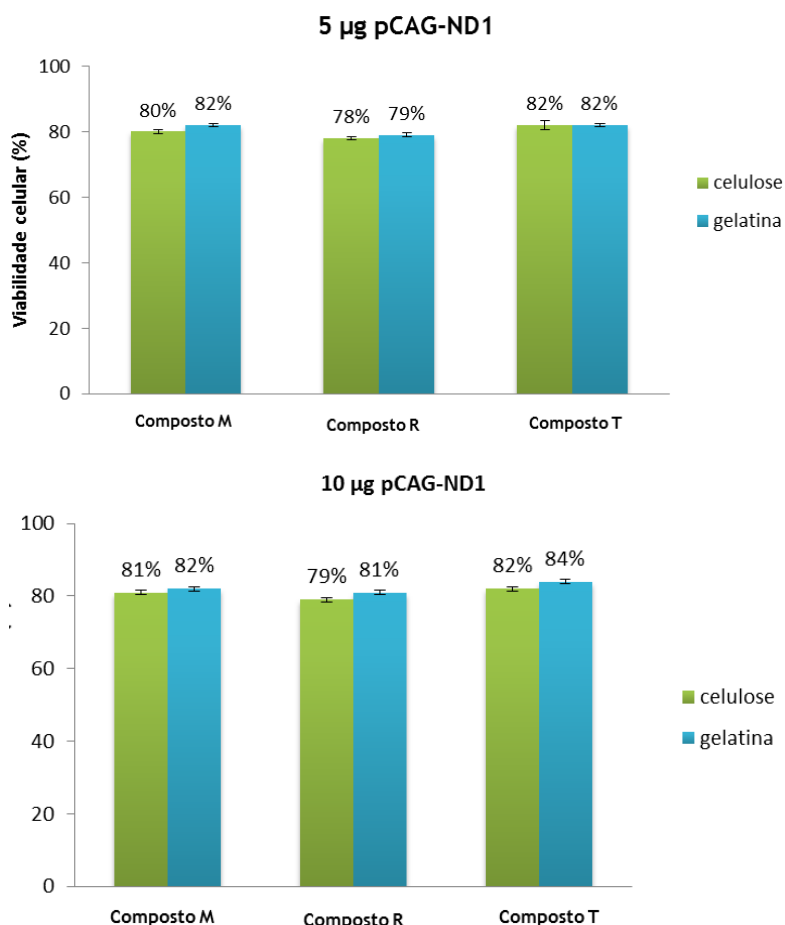
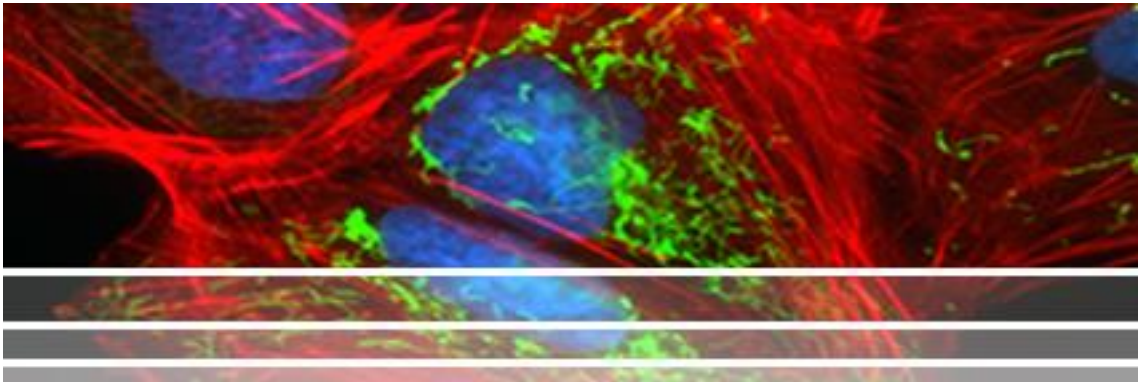


Figura 15- Perfil da citotoxicidade das nanopartículas em fibroblastos humanos após 48 de incubação. As percentagens de viabilidade celular são expressas relativamente ao controlo (100% viabilidade celular). Os dados foram obtidos pelo cálculo da média do resultado de 3 experiências. Os respetivos erros foram determinados abaixo de 1%. As barras de erro na figura representam os desvios padrão (isto é, \pm SD) das 3 experiências.

Pela análise da figura 15, as nanopartículas sintetizadas com diferentes quantidades de pCAG-ND1, diferentes polímeros e diferentes compostos (M,R e T) não apresentam efeitos citotóxicos significativos para as células fibroblastos humanos ao fim de 48h de incubação. Desta forma, as nanopartículas à base de carbonato de cálcio apresentam-se promissoras para aplicações de terapia génica mitocondrial.



6. Discussão

A investigação relacionada com a saúde pública e o tratamento de doenças tem sido cada vez mais exigente e crescente por parte da sociedade. O tratamento da maioria das doenças genéticas tem promovido a cooperação de diferentes áreas do conhecimento, numa tentativa de trazer e desenvolver novas estratégias que sejam capazes de atuar *in situ*, como é o caso da terapia génica.

As mitocôndrias são responsáveis por um vasto conjunto de doenças relacionadas com desordens neuromusculares, diabetes e cancro. Apesar da sua evolução nas metodologias de tratamento, a cura das desordens mitocondriais é ainda ineficiente.

A terapia de genes surge como uma ferramenta promissora na abordagem terapêutica de doenças baseadas em mutações do DNA mitocondrial.

O objetivo desta dissertação foi o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica baseada num vetor não-viral que seja capaz de transferir um gene de interesse terapêutico na mitocôndria. Foi desenvolvido um sistema que contém o gene mitocondrial ND1, o qual codifica uma das proteínas do *complexo I* da cadeia respiratória da mitocôndria e, acoplado a este, foram adicionados compostos fluorescentes derivados de acridina, naftaleno e quinolina com o intuito de monitorizar o processo de transfeção em futuras investigações.

A síntese dos compostos fluorescentes e a sua incorporação/caracterização das nanopartículas foi a estratégia inovadora do trabalho.

A localização dos compostos nos organelos celulares, mais concretamente na mitocôndria, poderá depender da aromaticidade, das cadeias das poliaminas utilizadas e até mesmo da junção de ambos.

Os compostos sintetizados utilizados nos estudos de citotoxicidade foram os compostos M (acridina e dietilenotriamina), R (naftaleno e tris (2-aminoetil) amina), T (quinolina e dietilenotriamina) e X (quinolina e tetraetilenopentamina).

A avaliação da sua citotoxicidade foi realizado pelo ensaio MTT em células fibroblastos humanos após 24, 48 e 72h de incubação. Além disso, também foi testado a viabilidade celular variando a concentração dos compostos. Os resultados apresentam-se satisfatórios à exceção do composto X que demonstrou ter efeitos citotóxicos.

A extração do gene ND1 de amostras de sangue de indivíduos saudáveis e a sua ligação ao pDNA foi realizada pelo nosso grupo num projeto anterior (Salvado et al. 2015). O plasmídeo em estudo (pCAG-ND1) foi amplificado numa estirpe de *E. coli* JM109 e purificado usando um *kit* apropriado. Foram obtidas as duas isoformas: *sc* e *oc*, sendo obtida em maiores rendimentos a isoforma *sc*, isoforma esta, que permite proporcionar uma maior compactação do plasmídeo assegurando uma eficiência de transfeção superior relativamente às outras isoformas.

As nanopartículas à base de pDNA/composto foram produzidas pelo método de co-precipitação. Este método consiste na junção de sais solúveis em água que formam aglomerados, como é o caso dos sais cloreto de cálcio e carbonato de sódio. Foram formadas nanopartículas com diferentes quantidades de pCAG-ND1 (5 µg e 10 µg), com os compostos M, R e T. Adicionalmente foram inseridos polissacarídeos biocompatíveis como a celulose e a

gelatina de forma a reduzir o tamanho, melhorar a estabilidade e aumentar a eficiência de transfeção celular.

Para a caracterização das nanopartículas foram realizados estudos como a análise da morfologia por SEM, tamanho e potencial Zeta por Zetasizer, capacidade de proteção do pDNA, percentagem de eficiência de encapsulação e avaliação da sua citotoxicidade.

As nanopartículas apresentaram uma geometria esférica ou oval e tamanhos de diâmetro reduzidos (170-300 nm), o que as torna adequadas para fins de entrega de genes. A utilização dos polímeros celulose e gelatina comprova que os polímeros aumentam a estabilidade do complexo, devido às interações electrostáticas que ocorre entre os grupos carboxilos do polímero com os iões Ca^{2+} . Esta estabilização foi mais notória para os sistemas com gelatina. O tamanho pequeno, à escala nano, dos sistemas criados torna-se um fator importante, pois as nanopartículas apresentam uma rápida capacidade de difusão, podendo chegar mais facilmente à célula alvo, onde podem exercer a sua função terapêutica.

Além do tamanho, é necessário correlacionar este parâmetro com o potencial de superfície do nano sistema. Os sistemas são mais estáveis e disperso quando se insere a gelatina e quando se utiliza maiores quantidades de pDNA. Os valores positivos do potencial zeta tornam-se importantes quando consideramos os mecanismos de transfeção celular que envolvem a interação com a membrana celular.

Apesar destes parâmetros, a capacidade de encapsulação e a citotoxicidade das nanopartículas devem ser avaliadas a fim de conceber um sistema de entrega de genes adequado. A eficiência de encapsulação para todos os sistemas na presença de compostos fluorescentes foi aproximadamente 45%. Os sistemas sintetizados com a celulose apresentam valores com percentagens de encapsulação superiores de encapsulação, além disso, os sistemas que contem 10 μ g de pDNA maior encapsulamento de plasmídeo. De acordo com a literatura (Santos et al. 2014; Costa et al. 2012) estes valores são razoáveis e apropriados à futura utilização destes sistemas em protocolos experimentais de terapia génica, nomeadamente estudos *in vitro* de avaliação da capacidade de transfeção.

Por fim, a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas foi conseguida por MTT em células fibroblastos humanos ao fim de 48h de transfeção. Os resultados demonstraram que o sistema pCAG-ND1 à base de carbonato de cálcio não é significativamente tóxico para as células, sugerindo que nenhuma resposta secundária é acionada quando se usam estes sistemas para fins terapêuticos.

Em suma, de acordo com o que foi referido anteriormente, nanopartículas à base de carbonato de cálcio, com quantidades de 10 μ g pDNA e com a gelatina, apresentam melhores características para serem utilizados no desenvolvimento de um sistema contínuo para a entrega do gene ND1.

6.1. Conclusões e Perspetivas Futuras

O desenvolvimento de um método seguro e eficaz para a entrega de genes na mitocôndria é um dos objetivos cruciais da terapia génica mitocondrial.

Na etapa inicial do trabalho, foi delineado o desenvolvimento de um protocolo terapêutico à escala nano com entrega de pDNA à base de nanopartículas de carbonato de cálcio para o tratamento de doenças mitocondriais, incorporando compostos fluorescentes.

Numa primeira fase, foi delineado a síntese de compostos fluorescentes derivados de acridina, naftaleno e quinolina para estudar a distribuição sub-celular. Numa segunda fase, foi delineado a sua incorporação e encapsulação juntamente com o plasmídeo pCAG-ND1, em nanopartículas à base de carbonato de cálcio formadas pelo método de co-precipitação, e por fim a caracterização e avaliação das nanopartículas sintetizadas.

Foi possível criar um nanosistema com gene codificante para o complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria com compostos fluorescentes que apresentam diferentes anéis aromáticos e cadeias de aminas distintas, com adição de polissacarídeos (gelatina e celulose) de forma a melhorar a estabilidade do sistema.

O sistema 10 μ g pCAG-ND1/gelatina/compostos criado apresenta morfologia, tamanho e carga de superfície adequados para uso em terapia génica. Além disso, permite encapsular eficazmente o conteúdo genético e protege-lo da ação das nucleases, o que se torna promissor em aplicações práticas, comparativamente a outros protocolos à base de celulose e rodamina 123 já existentes.

Como perspetiva futura, através da fluorescência destes compostos, será possível verificar por microscopia confocal a sua transfeção celular, a sua localização nos organelos celulares, especificamente na mitocôndria e devido às interações existentes com o pDNA confirmar onde este se encontram no espaço intracelular.

Outro ponto importante será a quantificação da expressão da proteína que o gene ND1 codifica e permitirá o desenvolvimento de um protocolo efetivo de terapia génica mitocondrial específico de desordens mitocondriais baseadas no complexo I.

No futuro, acredito que a terapia de genes com vista a mitocôndria possa ganhar outra perspetiva no tratamento da qualidade de vida de pessoas que sofram de citopatias mitocondriais e assim estabelecer um novo marco na medicina.

Referências bibliográficas

- Adams, J.M. & Cory, S., 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), pp.61-66.
- Adhya, S. et al., 2011. Mitochondrial gene therapy: The tortuous path from bench to bedside. *Mitochondrion*, 11(6), pp.839-844.
- Al-Dosari, M.S. & Gao, X., 2009. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4), pp.671-681.
- Bartoli, S. et al., 2009. Cu(ii) complexation with an acridine-containing macrocycle. Assembly of water cluster chains within the cavity of tetranuclear metallomacrocycles. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (7), pp.1223-1230.
- Bencini, A. et al., 1993. An Efficient Synthesis of Polyaza[n]paracyclophanes. *J. Org. Chem.*, 58(19), pp.4749-4753.
- Bencini, A. et al., 1987. Solution chemistry of macrocycles. 5. Synthesis and ligational behavior toward hydrogen and copper(II) ions of the large polyazacycloalkane 1,4,7,10,13,16,19,22,25-nonaazacycloheptacosane ([27]aneN9). *Inorganic Chemistry*, 26(5), pp.681-684.
- Boekema, E.J. & Braun, H.-P., 2007. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *The Journal of biological chemistry*, 282(1), pp.1-4.
- Bouard, D., Alazard-Dany, N. & Cosset, F.-L., 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British journal of pharmacology*, 157(2), pp.153-165.
- Budihardjo, I. et al., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, pp.269-290.
- Carole, D.G. et al., 2005. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(19), pp.5560-5568.
- Chatterjee, A., Mambo, E. & Sidransky, D., 2006. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34), pp.4663-4674.
- Chen, D. et al., 2003. Upregulation of mitochondrial base-excision repair capability within rat brain after brief ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(1), pp.88-98.
- Chinnery, P. & Schon, E.A., 2003. Mitochondria. *Journal Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74, pp.1188-1199.
- Chiron, J. & Galy, J.-P., 2003. Reactivity of the Acridine Ring: One-Pot Regioselective Single and Double Bromomethylation of Acridine and Some Derivatives. *Synlett*, (15), pp.2349-2350.
- Clares, M.P. et al., 2004. Synthesis and H⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ Coordination Behavior of a Bis (fluorophoric) Bibrachial Lariat Aza-Crown. *Inorganic Chemistry*, 43(19), pp.6114-6122.
- Collombet, J.-M. & Coutelle, C., 1998. Towards gene therapy of mitochondrial disorders. *Molecular medicine today*, 4(1), pp.31-38.

- Costa, D. et al., 2012. Plasmid DNA Microgels for a Therapeutic Strategy Combining the Delivery of Genes and Anticancer Drugs. *Macromolecular Bioscience*, 12(9), pp.1243-1252.
- Croteau, D.L. & Bohr, V.A., 1997. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(41), pp.25409-25412.
- Croteau, D.L., Stierum, R.H. & Bohr, V.A., 1999. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Research*, 434(4), pp.137-148.
- Cruz, C. et al., 2011. Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PLoS ONE*, 6(11).
- Cwerman-Thibault, H. et al., 2014. Gene therapy for mitochondrial diseases: Leber Hereditary Optic Neuropathy as the first candidate for a clinical trial. *Comptes Rendus - Biologies*, 337(3), pp.193-206.
- Cwerman-Thibault, H., Sahel, J.-A. & Corral-Debrinski, M., 2011. Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(2), pp.327-344.
- DiMauro, S., 2001. Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Cell & developmental biology*, 9(6), pp.397-405.
- DiMauro, S. & Hirano, M., 2005. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscular Disorders*, 15(4), pp.276-286.
- Doyle, S.R. & Chan, C.K., 2008. Mitochondrial gene therapy: an evaluation of strategies for the treatment of mitochondrial DNA disorders. *Human gene therapy*, 19(12), pp.1335-1348.
- Dudkina, N. V. et al., 2008. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: Mitochondrial supercomplexes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), pp.419-424.
- Edelstein, M.L. et al., 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - An overview. *Journal of Gene Medicine*, 6(6), pp.597-602.
- Gaspar, V.M. et al., 2011. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, 22(1), p.015101.
- Griffiths, E.J. et al., 1998. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 39(2), pp.423-433.
- Gullotti, E. & Yeo, Y., 2009. Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 6(4), pp.1041-1051.
- Han, J.-Y. et al., 2014. Adult onset Leigh syndrome with mitochondrial DNA 8344 A>G mutation. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(11), pp.2009-2011.
- Heller, A., Brockhoff, G. & Goepferich, A., 2012. Targeting drugs to mitochondria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1), pp.1-18.
- Indran, I.R. et al., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), pp.735-745.

- Jeong, S.-Y. & Seol, D.-W., 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB report*, 41, pp.11-22.
- Kamimura, K. et al., 2011. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceutical Medicine*, 25(5), pp.293-306. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF03256872>.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7(1), pp.33-40.
- Kazak, L., Reyes, A. & Holt, I.J., 2012. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(11), pp.659-671.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M.R.-R., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual review of physiology*, 60, pp.619-642.
- Larsen, N.B., Rasmussen, M. & Rasmussen, L.J., 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: Similar pathways? *Mitochondrion*, 5(2), pp.89-108.
- Leon, J. et al., 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*, 75(7), pp.765-790.
- Lesnefsky, E.J. et al., 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(6), pp.1065-1089.
- Li, S. & Huang, L., 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene therapy*, 7(1), pp.31-34.
- Limberis, M.P., 2012. Phoenix rising: Gene therapy makes a comeback. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(8), pp.632-640.
- Martin, L.J., 2012. *Biology of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases*,
- Martinou, J.-C. & Youle, R.J., 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*, 21(1), pp.92-101.
- Mazunin, I.O. et al., 2010. Mitochondrial genome and human mitochondrial diseases. *Molecular Biology*, 44(5), pp.665-681.
- Mehier-Humbert, S. & Guy, R.H., 2005. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(5), pp.733-753.
- Munier, S. et al., 2005. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: Comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43(3-4), pp.163-173.
- Murphy, M.P. & Smith, R.A.J., 2000. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41, pp.235-250.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2008. Lehninger Principles of Biochemistry 5th ed. *Book*, pp.1-1294. (página de consulta 708)
- Pack, D.W. et al., 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(7), pp.581-593.
- Pakendorf, B. & Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual review of genomics and human genetics*, 6, pp.165-183.

- Pereira, P. et al., 2012. Characterization of polyplexes involving small RNA. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), pp.84-94.
- Qiao, W. et al., 2010. Cancer therapy based on nanomaterials and nanocarrier systems. *Journal of Nanomaterials*, 2010, pp.1-9.
- Read, M.L., Logan, A. & Seymour, L.W., 2005. Barriers to Gene Delivery Using Synthetic Vectors. *Advances in Genetics*, 53(05), pp.19-46.
- Robertson, A.B. et al., 2009. Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), pp.981-993.
- Rodenburg, R.J.T., 2011. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), pp.283-292.
- Salvado, R. et al., 2015. Development of mitochondrial targeting plasmid DNA nanoparticles: Characterization and in vitro studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, pp.287-295.
- Samal, S.K. et al., 2012. Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chemical Society Reviews*, 41(21), p.7147.
- Sangro, B., Herraiz, M. & Prieto, J., 2003. Gene therapy of hereditary liver diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35, pp.135-148.
- Sangro, B., Herraiz, M. & Prieto, J., 2003. Gene therapy of neoplastic liver diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(2), pp.135-148.
- Santos, J. et al., 2014. Rhodamine based plasmid DNA nanoparticles for mitochondrial gene therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, pp.129-140.
- Satrústegui, J., Pardo, B. & Del Arco, A., 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological reviews*, 87(1), pp.29-67.
- Schultz, B.E. & Chan, S.I., 2001. Structures and Proton -Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 30, pp.23-65.
- Shadel, G.S. & Clayton, D.A., 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual review of biochemistry*, 66, pp.409-435.
- Shi, Y., 2001. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature structural biology*, 8(5), pp.394-401.
- Suen, D.-F., Norris, K.L. & Youle, R.J., 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, 22(301), pp.1577-1590.
- Takao, M. et al., 1998. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research*, 26(12), pp.2917-2922.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A., 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*, 4(5), pp.346-358.
- Torchilin, V.P., 2012. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp.302-315.

- Tsujimoto, Y., 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3(11), pp.697-707.
- Tuppen, H.A.L. et al., 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(2), pp.113-128.
- Ueno, Y. et al., 2005. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. *Journal of Controlled Release*, 103(1), pp.93-98.
- Vercauteren, D. et al., 2012. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods. *Journal of Controlled Release*, 161(2), pp.566-581.
- Wallace, D.C., 1992. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annual review of biochemistry*, 61, pp.1175-1212.
- Wang, C. & Youle, R.J., 2009. The role of mitochondria in apoptosis. *Annual review of genetics*, 43, pp.95-118.
- Weissing, V. et al., 1998. DQAsomes A novel potential drug and gene delivery system made from dequalinium. , pp.334-337.
- Wong, T.W. & Clayton, D. a, 1985. In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell*, 42(3), pp.951-958.
- Xu, B.-Y. et al., 2012. Liquid-gas dual phase microfluidic system for biocompatible CaCO₃ hollow nanoparticles generation and simultaneous molecule doping. *Chemical Communications*, 48(95), pp.11635-11637.
- Yamada, Y. et al., 2011. Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(8), pp.1449-1456.
- Yamada, Y. & Harashima, H., 2008. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(13-14), pp.1439-1462.
- Zeviani, M. & Di Donato, S., 2004. Mitochondrial disorders. *Brain*, 127(10), pp.2153-2172.
- Zhao, D., Zhuo, R.-X. & Cheng, S.-X., 2012. Alginate modified nanostructured calcium carbonate with enhanced delivery efficiency for gene and drug delivery. *Molecular BioSystems*, 8(3), pp.753-759.